

Warszawa, 29.12.2023

dr hab. inż. Anna Bzducha-Wróbel, prof. SGGW  
e-mail: [anna\\_bzducha\\_wrobel@sggw.edu.pl](mailto:anna_bzducha_wrobel@sggw.edu.pl)  
Tel: +48 22 593 76 56

### **Recenzja rozprawy doktorskiej**

przygotowanej przez **Pana mgr inż. Michała Jakuba Wójcickiego**,  
zatytułowanej: **„Wykorzystanie potencjału bakteriofagów  
w biokontroli wybranych bakterii z rzędu Enterobacterales  
występujących w łańcuchu żywnościowym”**,  
wykonanej w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-  
Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowym  
Instytucie Badawczym w Warszawie  
pod opieką promotorską  
dr hab. Edyty Juszcuk-Kubiak, prof. IBPRS-PIB  
oraz dr hab. inż. Barbary Sokołowskiej, prof. IBPRS-PI

Niniejszą opinię sporządzono w zakresie oceny spełnienia warunków, jakie stawiane są dysertacji doktorskiej w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w świetle obowiązujących przepisów prawa, zdefiniowanych w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Podstawą formalno-prawną wykonania niniejszej recenzji jest uchwała nr X/75/2023 Rady Naukowej Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie.

---

Szkoła Główna Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie

Instytut Nauk o Żywności  
Katedra Biotechnologii  
i Mikrobiologii Żywności

ul. Nowoursynowska 159C  
02-776 Warszawa  
+48 22 593 76 53  
[kbmz@sggw.edu.pl](mailto:kbmz@sggw.edu.pl)  
[www.sggw.edu.pl](http://www.sggw.edu.pl)

**Przedstawienie informacji o rozprawie doktorskiej w odniesieniu do elementów  
podlegających ocenie wraz z uzasadnieniem oceny**

Przedstawiona do oceny praca doktorska pt: „**Wykorzystanie potencjału bakteriofagów w biokontroli wybranych bakterii z rzędu Enterobacterales występujących w łańcuchu żywnościowym**” przygotowana została w trybie eksternistycznym. Treść pracy przedstawiono w podziale na: Wstęp, Wykaz stosowanych skrótów oraz rozdziały: Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego przedkładanego do oceny (Rozdział 1), Przegląd piśmiennictwa (Rozdział 2), Hipotezy badawcze, cel i zakres pracy (Rozdział 3), Materiał doświadczalny i metody badań (Rozdział 4), Omówienie osiągnięć badawczych przedstawionych do oceny (Rozdział 5), Stwierdzenia i wnioski (Rozdział 6), Spis piśmiennictwa (Rozdział 7) oraz Aneks, w którym zestawiono pełne teksty publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego (Rozdział 8), stanowiącego podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia. Łącznie opracowanie zawarto na 381 stronach, z czego 90 stanowi autoreferat.

Wskazane przez Doktoranta osiągnięcie naukowe jest zbiorem powiązanych tematycznie pięciu artykułów naukowych o łącznym współczynniku IF = 24,739 (zgodnie z rokiem publikacji) oraz 580 pkt. MEiN. Publikacje opublikowano w latach 2021-2023 w czasopismach *International Journal of Molecular Sciences* (dwie prace), *Viruses* oraz *Pathogens* (dwie prace). Są to następujące prace:

- [P1] Wójcicki M., Średnicka P., Błażej S., Gientka I., Kowalczyk M., Emanowicz P., Świder O., Sokołowska B., Juszcuk-Kubiak E. (2021). Characterization and genome study of novel lytic bacteriophages against prevailing saprophytic bacterial microflora of minimally processed plant-based food products. *International Journal of Molecular Sciences*, DOI:10.3390/ijms222212460 (IF2021 = 6,208; 140 pkt. MEiN);
- [P2] Wójcicki M., Świder O., Gientka I., Błażej S., Średnicka P., Shymialevich D., Cieślak H., Wardaszka A., Emanowicz P., Sokołowska B., Juszcuk-Kubiak E. (2023). Effectiveness of a phage cocktail as a potential biocontrol agent against saprophytic bacteria in ready-to-eat plant-based food. *Viruses*, DOI:10.3390/v15010172 (IF2022 = 4,7; 100 pkt. MEiN);
- [P3] Wójcicki M., Świder O., Daniluk K.J., Średnicka P., Akimowicz M., Roszko M.Ł., Sokołowska B., Juszcuk-Kubiak E. (2021). Transcriptional regulation of the multiple resistance mechanisms in *Salmonella* – a review. *Pathogens*, DOI:10.3390/pathogens10070801 (IF2021 = 4,531; 100 pkt. MEiN);
- [P4] Wójcicki M., Chmielarczyk A., Świder O., Średnicka P., Strus M., Kasperski T., Shymialevich D., Cieślak H., Emanowicz P., Kowalczyk M., Sokołowska B., Juszcuk-Kubiak E. (2022). Bacterial pathogens in the food industry: antibiotic resistance and virulence factors of



Salmonella enterica strains isolated from food chain links. Pathogens, DOI:10.3390/pathogens11111323 (IF2022 = 3,7; 100 pkt. MEiN).

[P5] Wójcicki M., Świder O., Średnicka P., Shymialeovich D., Ilczuk T., Koperski Ł., Cieślak H., Sokołowska B., Juszczuk-Kubiak E. (2023). Newly isolated virulent salmophages for biocontrol of multidrug-resistant Salmonella in ready-to-eat plant-based food. International Journal of Molecular Sciences, DOI:10.3390/ijms241210134 (IF2022 = 5,6; 140 pkt. MEiN).

Wskazane prace to opracowania wieloautorskie o bardzo rozbudowanym zakresie badawczym i metodycznym, co uzasadnia podjętą szeroką współpracę. Umożliwiła ona Doktorantowi zrealizowanie założonych szczegółowych celów badań z wykorzystaniem bardzo dobrego warsztatu badawczego, jak również dokonać interpretacji uzyskanych wyników przy wsparciu merytorycznym specjalistów z zakresu wykorzystywanych procedur analitycznych. Należy podkreślić, że dążenie, otwartość i umiejętność pracy w zespole, w tym z ekspertami z różnych dziedzin i ośrodków naukowych, jest niezmiernie cenne i konieczne do realizacji interdyscyplinarnego zakresu badań na wysokim poziomie naukowym. Taka współpraca jest bardzo ważna dla rozwoju naukowego młodego naukowca.

Zgodnie z oświadczeniami głównego Autora publikacji i współautorów, załączonymi do wszystkich 5 prac, **udział Pana mgr inż. Michała Wójcickiego polegał na:**

- opracowaniu koncepcji wszystkich zaplanowanych prac oraz głównego celu badań i celów szczegółowych (przy wsparciu merytorycznym opiekunów naukowych);
- samodzielnym ustaleniu zakresu badań, opracowaniu i optymalizacji metod badawczych niezbędnych do realizacji postawionych celów (także przy wsparciu współautorów, w zależności od publikacji);
- realizacji wszystkich zaplanowanych prac eksperymentalnych o bardzo szerokim zakresie w odniesieniu do materiału badawczego i wykonywanych oznaczeń, co należy podkreślić, bowiem uzasadnia pomoc współautorów w realizacji rozległego planu prac eksperymentalnych, przedstawionych w dalszej części recenzji;
- nadzorowaniu prawidłowego wykonania części doświadczalnych, dokonaniu analizy i interpretacji uzyskanych wyników (także przy wsparciu współautorów w przypadku wykonywania specjalistycznych analiz);
- dokonaniu bardzo wnikliwego przeglądu dostępnych danych literaturowych do przygotowania wstępu teoretycznego prac oraz omówienia i dyskusji uzyskanych wyników;
- opracowaniu graficznym wszystkich tabel oraz rysunków (także z pomocą współautorów, w zależności od publikacji);

- przygotowaniu wszystkich tekstów manuskryptów, ich edycji oraz udzielaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów (przy wsparciu merytorycznym opiekunów naukowych) oraz korespondencji z redakcją.

Biorąc pod uwagę wskazany zakres prac wykonanych przez Pana mgr inż. Michała Wójcickiego należy uznać, że jego udział w osiągnięciu naukowym był wiodący, jednocześnie zakres zrealizowanych przez Doktoranta prac potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

We wstępie do dysertacji uzasadniono tematykę podjętych badań, wskazując potrzebę opracowania innowacyjnych, łagodnych metod utrwalania żywności, które umożliwiłyby eliminację mikroflory dominującej w żywności o minimalnym stopniu przetworzenia, szczególnie szczepów bakterii wielolekoopornych. Doktorant nakreślił istotny problem związany z identyfikowanym rozprzestrzenianiem się antybiotykooporności wśród drobnoustrojów izolowanych z łańcucha żywnościowego. Należy tu wskazać, że ograniczenie tego zjawiska to jedno z wyzwań, które wpisane jest w strategię „Od pola do stołu”, wynikającą z celów europejskiego Zielonego Ładu, jakie stawiają sobie państwa Unii Europejskiej na najbliższe lata. Wskazana strategia ma pomóc zapewnić zdrowszą i bardziej zrównoważoną żywność w Europie, m.in. dzięki ograniczeniu stosowania antybiotyków. Niewłaściwe stosowanie antybiotyków w leczeniu ludzi, zwierząt czy ochronie roślin doprowadza do nabywania przez drobnoustroje oporności na te substancje i rozprzestrzeniania się oporności w środowisku. Oporność nabyta jest konsekwencją zmian w genomie bakterii, które dokonują się na skutek mutacji losowych i horyzontalnego transferu genów, w którym zasadniczą rolę odgrywają ruchome elementy genetyczne, w tym plazmidy, ale również bakteriofagi. Przenoszenie genów między komórkami za pośrednictwem wirusów bakteryjnych, określane mianem transdukcji fagowej, jest mechanizmem ewolucji genomów bakteryjnych. Bakteriofagi są wskazywane jako nośniki genów oporności na antybiotyki w systemach rolno-spożywczych. Na to zagrożenie Doktorant zwraca krytycznie uwagę w kontekście bezpieczeństwa wykorzystania preparatów fagowych, omówionego w dalszej części pracy.

Surowce spożywcze zanieczyszczone na etapie produkcji pierwotnej drobnoustrojami opornymi na antybiotyki mogą stanowić wektor transmisji lekooporności w przemyśle spożywczym. Doktorant zainteresował się zagrożeniem w odniesieniu do żywności minimalnie przetworzonej, dążąc do określenia, czy jest ona źródłem drobnoustrojów opornych na antybiotyki. Żywność minimalnie przetworzona oznacza produkty poddane możliwie jak najmniejszej, „łagodnej” obróbce technologicznej bez wykorzystania substancji dodatkowych dla osiągnięcia założonej trwałości produktu, zdefiniowanej terminem przydatności do spożycia, obejmującym transport i dystrybucję. Żywność ta zachowuje cechy świeżości surowców, spełniając szerokokorozumiane wymagania konsumentów odnośnie jakości (w tym odżywczej), dlatego jest



bardzo pożądana na rynku. Są to najczęściej produkty pochodzenia roślinnego. Zminimalizowane podejście technologiczne w zakresie utrwalenia takich produktów w mniejszym stopniu ogranicza naturalną mikroflorę surowców. Jednocześnie wykorzystywane w technologii minimalnego przetwarzania operacje jednostkowe związane z obieraniem, cięciem i rozdrabnianiem surowców powodują wyciek komórkowy i zwiększają natlenienie surowca, przez co ułatwiają i stymulują wzrost mikroorganizmów autochtonicznych. Powoduje to szybsze obniżenie jakości produktu w czasie przechowywania, co może przełożyć się na bezpieczeństwo produktu, a w przypadku zepsucia lub niewykorzystania w terminie trwałości, powoduje straty ekonomiczne i marnowanie żywności. Mikroorganizmy odpowiedzialne za psucie produktów roślinnych minimalnie przetworzonych to liczne gatunki grzybów i bakterii, zarówno Gram-ujemnych, wśród których dominują bakterie z rzędów Enterobacterales (głównie rodziny Enterobacteriaceae, Erwiniaceae i Yersiniaceae) oraz Pseudomonadales (rodzina Pseudomonadaceae), jak i bakterii Gram-dodatnich, wśród których przeważają bakterie kwasu mlekowego (LAB).

Pobyt na produkty niskoprzetworzone o wysokiej wartości odżywczej, zachowujących walory organoleptyczne surowców świeżych, stymuluje przemysł spożywczy do opracowywania innowacyjnych, niekonwencjonalnych, nietermicznych metod utrwalania oraz udoskonalania rozwiązań już wykorzystywanych w produkcji bezpiecznej, minimalnie przetworzonej żywności o pożądanej jakości i dłuższej przydatności do spożycia. To także bardzo istotne zadanie w kontekście zrównoważonej produkcji żywności i ograniczania jej marnotrawstwa. Tu pozwalam sobie wskazać, że według najnowszego raportu „Data & Trends of the EU Food and Drink Industry” przygotowywanego przez Food Drink Europe wynika, że w Unii Europejskiej (UE) ok. 10% produkowanej żywności jest marnotrawiona lub tracona, podczas gdy w skali globalnej jest to ok. 13%. Tylko 2021 roku w Europie zmarnowano ok. 58 milionów ton produktów spożywczych, co odpowiada średnio 131 kg/osobę i ok. 16% gazów cieplarnianych emitowanych przez system żywnościowy w UE. Innowacje w zakresie zrównoważonych sposobów utrwalania żywności, w tym nietermicznych, są zatem bardzo potrzebne. Zaproponowaną przez Pana mgr inż. Michała Wójcickiego alternatywą wobec konwencjonalnych metod utrwalania żywności minimalnie przetworzonej jest wykorzystanie ściśle litycznej aktywności bakteriofagów. Jak wskazuje Doktorant, takie rozwiązanie może stanowić obiecującą, całkowicie naturalną, biologiczną metodę zapewnienia bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności w celu ochrony zdrowia konsumentów oraz przedłużenia trwałości produktów spożywczych z zachowaniem jakości sensorycznej surowca świeżego. Ponadto biopreparaty fagowe o wysokiej specyficzności litycznej mogą znaleźć zastosowanie na etapie produkcji pierwotnej w hodowli zwierząt, np. do ograniczania nosicielstwa bakterii *Salmonella* i *Campylobacter* i zwalczania innych zakażeń o etiologii bakteryjnej w ramach terapii fagowej, zastępującej antybiotykoterapię. Takie podejście może minimalizować transfer antybiotykooporności w środowisku. Możliwe jest także zastosowanie fagów w zakładach produkcyjnych w celu zapobiegania tworzenia biofilmów na



powierzchni sprzętu (biosanitaryzacja). Jednakże skuteczna biokontrola w przemyśle rolnospożywczym wymaga opracowywania preparatów zawierających koktajl różnych fagów o możliwie szerokim spektrum aktywności wobec bakteryjnych gospodarzy. Doktorant postanowił wyizolować bakteriofagi o aktywności litycznej w odniesieniu do mikroflory dominującej w roślinnych produktach minimalnie przetworzonych oraz bakteriofagi skuteczne w eliminacji wielolekoopornych pałeczek *Salmonella*, wyizolowanych na przestrzeni lat z różnych ogniw łańcucha żywnościowego i ocenić ich aktywność lityczną w produktach spożywczych.

Reasumując tę część oceny należy wskazać, że podjęta przez Pana mgr inż. Michała Wójcickiego tematyka badań wpisuje się we współczesne, innowacyjne trendy badawcze w ramach dyscypliny technologia żywności i żywienia, których idea jest opracowanie nowych metod utrwalania żywności, wpisujących się w cele zdrowego i przyjaznego dla środowiska systemu żywnościowego.

W rozdziale 2. Przegląd piśmiennictwa dokonano przejrzystego omówienie najważniejszych zagadnień teoretycznych, związanych z tematem pracy, co również miało miejsce w rozdziałach wprowadzających publikacji oryginalnych – publikacje P1, P2, P4 i P5. Publikacja P3 stanowi natomiast bardzo szczegółowy przegląd literatury dotyczący charakterystyki pałeczek z rodzaju *Salmonella*, ich podziału taksonomicznego, zakresu gospodarzy, a przede wszystkim regulacji transkrypcji różnych mechanizmów oporności ze szczególnym uwzględnieniem wielolekooporności. Opisano także patogenezę bakterii *Salmonella* ze szczególnym uwzględnieniem roli wysp patogenności. We wskazanym rozdziale pracy doktorskiej Pan mgr inż. Michał Wójcicki zaprezentował w pierwszej kolejności definicję żywności o minimalnym stopniu przetworzenia i jej ogólną charakterystykę, omówił zagrożenia mikrobiologiczne typowe dla minimalnie przetworzonych produktów roślinnych oraz przedstawił najczęściej wykorzystywane metody utrwalania żywności minimalnie przetworzonej. Następnie scharakteryzował żywność jako wektor bakterii antybiotykoopornych, przedstawił ogólną klasyfikację antybiotyków i mechanizmy działania wybranych antybiotyków na komórkę bakteryjną. W kolejnym podrozdziale omówił antybiotykooporność i mechanizmy oporności pałeczek z rzędu Enterobacterales, dominujących w minimalnie przetworzonych produktach roślinnych, będących materiałem badań w ramach ocenianej pracy. W kolejnym podrozdziałach opisał naturalną oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe pałeczek z rzędu Enterobacterales, omówił bakteriofagi jako naturalną metodę biokontroli mikrobioty bakteryjnej w żywności, zaprezentował klasyfikację bakteriofagów, cykle infekcji fagowych, z podkreśleniem istotności ściśle litycznego charakteru fagów dla osiągnięcia efektywnego poziomu biokontroli wybranych bakterii w łańcuchu żywnościowym. W ramach przygotowanego przeglądu literatury omówiono także korzyści i zagrożenia związane z wykorzystaniem bakteriofagów w przemyśle spożywczym. Jest to bardzo ważny rozdział ocenianej pracy, podkreślający dojrzałe podejście Doktoranta do



realizowanych badań. Ponadto w omówieniu teoretycznym Pan mgr inż. Michał Wójcicki zwrócił uwagę na aspekty prawne związane z wykorzystaniem bakteriofagów w przemyśle rolnospożywczym, podając jednocześnie przykłady koktajli bakteriofagowych już dostępnych komercyjnie w krajach poza Unią Europejską, w tym stosowanych do biokonserwacji żywności.

Bibliografia wykorzystana przez Doktoranta do przygotowania rozprawy doktorskiej nie budzi moich zastrzeżeń.

Na podstawie informacji teoretycznych zawartych w rozdziale 2 rozprawy doktorskiej, jak również w artykułach P1-P5, włączając w ten zakres oceny dyskusję uzyskanych wyników z danymi literaturowymi, należy podkreślić, że Pan mgr inż. Michał Wójcicki bardzo dobrze orientuje się w problematyce szczegółowej będącej przedmiotem rozprawy. Przedłożona rozprawa doktorska potwierdza wysoki poziom merytoryczny i dogłębność prezentowanych informacji, pozwalając bardzo wysoko ocenić ogólną wiedzę teoretyczną Pana mgr inż. Michała Wójcickiego w zakresie tematyki rozprawy.

Podczas czytania rozdziału 2. Przegląd literatury ocenianej rozprawy nasunęły się jednak następujące uwagi i pytania, które mają charakter uzupełniający, a także dyskusyjny i charakteryzują się zróżnicowanym stopniem istotności i szczegółowości:

1. W podrozdziale 2.1.1. Zagrożenia mikrobiologiczne w minimalnie przetworzonych produktach roślinnych na Rysunku 1. wskazano, że mikroflora saprofityczna wpływa tylko na jakość produktów pochodzenia roślinnego. Należy tu zwrócić uwagę, że produkt nienadający się do spożycia, czyli, np. przejawiający cechy zepsucia w efekcie aktywności metabolicznej mikroflory saprofitycznej jest produktem klasyfikowanym jako niebezpieczny, zatem mikroflora saprofityczna również wpływa na bezpieczeństwo żywności. Autor pracy był ponadto w pewnym stopniu niekonsekwentny w odniesieniu do wskazanych w tekście pracy grup mikroorganizmów odpowiedzialnych za psucie produktów roślinnych - na schemacie zawężono informacje jedynie do trzech rodzin bakterii.
2. W podrozdziale 2.1.1. na str. 23 pracy wskazano że: „Według Rozporządzenia (WE) 2073/2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych (z dnia 15.11.2005 r. z późniejszymi zmianami), przypadku warzyw, owoców i produktów pochodnych europejskie ustawodawstwo normuje jedynie poziom Gram-ujemnych pałeczek z gatunku *Escherichia coli* w owocach i warzywach krojonych (gotowych do spożycia) oraz w niepasteryzowanych sokach owocowych i warzywnych (gotowych do spożycia), a wymagania te dotyczą jakości mikrobiologicznej procesu produkcyjnego.” Tymczasem w przypadku gotowych do spożycia owoców i warzyw krojonych, niepasteryzowanych soków owocowych i warzywnych i kiełków, cytowane rozporządzenie wskazuje również limity w ramach kryteriów bezpieczeństwa w odniesieniu do *Listeria monocytogenes*, oprócz

*Am*



pałeczek *Salmonella*, które Doktorant wspomniał w sposób ogólny w odniesieniu do produktów spożywczych.

3. W podrozdziale 2.1.2. Metody utrwalania żywności minimalnie przetworzonej na str. 26 wskazano, że składniki odżywcze i przyprawy jako dodatki do żywności, tymczasem z definicji nie są to dodatki do żywności.
4. W podrozdziale 2.3.2. Cykle infekcji fagowych wskazano, że „Cykl lityczny jest dominujący w warunkach, w których bakteryjni gospodarze mogą się namnażać i osiągać duże zagęszczenie, z kolei lizogenia jest na ogół wybierana, gdy liczebność bakterii jest niska” – w tym przypadku rodzi się pytanie, jak Doktorant definiuje niską liczebność bakterii? Jaka jest minimalna liczba komórek bakterii pobudzająca lityczną ścieżkę infekcji bakteriofagowej konieczną w biokonserwacji żywności? Proszę o odpowiedź na postawione pytanie również w kontekście zrealizowanych badań, ponieważ w pracy nie przedstawiono wyników zależności między gęstością optyczną hodowli bakterii a ich liczbą.
5. W podrozdziale 2.3.3 omówiono pseudolizogenię jako alternatywną odmianę cyklu lizogenego bakteriofagów, która może być wynikiem infekcji fagami zjadliwymi. W tym miejscu rodzi się pytanie, czy obecność obcego materiału genetycznego w komórce bakterii może sprzyjać selekcji opornych szczepów bakterii, a jeśli tak, czy można przewidywać taki sposób nabywania oporności na fagi?
6. Rysunek 6. mógłby bardziej czytelnie wskazywać korzyści i zagrożenia związane z wykorzystaniem bakteriofagów jako czynników biokontroli żywności. Na rysunku korzyści zaznaczono kolorem zielonym, ograniczenia żółtym, a zagrożenia czerwonym, nie dając opisu znaczenia kolorów, co może w utrudniać czytelnikowi niezwiązanemu z tematyką pracy zrozumienie schematu.
7. W tekście pracy (np., str. 37) pojawiło się niepoprawne sformułowanie „koktajlów fagowych” zamiast „koktajli fagowych”, powtórzone także w innych częściach pracy, np. opisie metodyki pracy i omówieniu wyników.
8. W podrozdziale 2.3.4. Aspekty prawne związane z wykorzystaniem bakteriofagów w przemyśle rolno-spożywczym na str. 39 wskazano Holandię jako kraj spoza UE.
9. W podrozdziale 2.3.4. wskazano błędnie, bo w sposób uogólniony, że bakteriofagowy preparat paszowy Bafasal® (Proteon Pharmaceuticals SA) jest skuteczny wobec pałeczek z rodzaju *Salmonella*. Preparat ten ma potwierdzoną skuteczność jedynie wobec szczepu *Salmonella* Gallinarum B/00111 dla wszystkich gatunków ptaków. Najnowsza opinia Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności i Pasz dotycząca wskazanego preparatu (Safety and efficacy of a feed additive consisting of the bacteriophages PCM F/00069, PCM F/00070, PCM F/00071 and PCM F/00097 (Bafasal®) for all avian species (Proteon Pharmaceuticals S.A.) EFSA Journal 2023;21(3):7861) wskazuje, że nie można wyciągnąć żadnych wniosków na temat zdolności preparatu Bafasal® do zmniejszania skażenia innymi



szczepami *Salmonella enterica*, serotypami lub innymi gatunkami *Salmonella*. Wskazano, że potencjał preparatu w ograniczaniu zanieczyszczenia tusz drobiowych i/lub środowiska bakteriami *Salmonella* spp. jest ograniczony. Ponadto Panel ds. Dodatków i Produktów lub Substancji Wykorzystywanych w Paszach dla Zwierząt (FEEDAP) zalecił plan monitorowania po wprowadzeniu do obrotu, mający na celu uwzględnienie potencjalnej selekcji i rozprzestrzeniania się wariantów *Salmonella* opornych na preparat Bafasal®.

Wnikliwe zapoznanie się z zagadnieniami teoretycznymi związanymi z tematyką pracy doktorskiej umożliwiły Doktorantowi na sformułowanie głównego celu badań, hipotez badawczych oraz przedstawienie założeń badawczych, które zdefiniowały szczegółowe zadania badawcze. Zostały one przedstawione w Rozdziale 3. Pracy, ale także w publikacjach prezentujących wyniki badań (P1, P2, P4 i P5). Głównym celem badań Pana mgr inż. Michała Wójcickiego była ocena możliwości wykorzystania bakteriofagów litycznych w biokontroli żywności minimalnie przetworzonej pochodzenia roślinnego. Zdefiniował dwie hipotezy badawcze w postaci:

**HIPOTEZA 1:** Gram–ujemne bakterie występujące w łańcuchu żywnościowym cechuje nabyta oporność na powszechnie stosowane środki przeciwdrobnoustrojowe, co decyduje o ich znacznym udziale w transferze antybiotykoodporności w środowisku żywności.

**HIPOTEZA 2:** Bakteriofagi lityczne o szerokim zakresie bakteryjnych gospodarzy są skuteczną metodą biokontroli bakterii saprofitycznych i patogennych, w tym wielolekoopornych, w środowisku żywności.

Badania zaplanowane przez Doktoranta obejmowały pięć celów szczegółowych, które zdefiniowały następujące zadania badawcze:

1. Genetyczna identyfikacja i klasyfikacja wybranych szczepów bakterii z rzędu Enterobacterales wyizolowanych z łańcucha żywnościowego.
2. Określenie profili oporności na wybrane antybiotyki oraz mechanizmów antybiotykoodporności pałeczek z rzędu Enterobacterales.
3. Określenie aktywności wyizolowanych bakteriofagów oraz zakresu bakteryjnych gospodarzy.
4. Analizę morfologiczną i charakterystykę genomyczną wytypowanych bakteriofagów.
5. Ocenę skuteczności koktajlu bakteriofagowego w poprawie jakości mikrobiologicznej wybranych minimalnie przetworzonych matryc żywnościowych.

Na podstawie informacji zawartych w Rozdziale 4. Materiał doświadczalny i metody badań oraz w części metodycznej załączonych publikacji P1, P2, P4 i P5 należy doprecyzować, że w ramach zaplanowanych badań Doktorant podjął próbę określenia skali problemu występowania szczepów antybiotykkoopornych bakterii wyizolowanych z komercyjnie

dostępnych minimalnie przetworzonych produktów spożywczych pochodzenia roślinnego, tj. rukoli, mieszanki sałat z marchewką, mieszanki sałat z burakiem. Zaplanował i zrealizował zidentyfikowanie szczepów pałeczek *Salmonella* niosących geny oporności na antybiotyki, wyizolowanych z różnych ogniw łańcucha żywnościowego na przestrzeni lat 1981-2019, zdeponowanych w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych – Centrum Zasobów Mikrobiologicznych Zakładu Mikrobiologii Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowego Instytutu Badawczego (IBPRS-PIB). Następnie podjął próbę wyizolowania ze ścieków komunalnych wirulentnych bakteriofagów i sprawdzenia efektywności ich działania na poziomie eliminacji (zahamowania/ograniczenia wzrostu i rozwoju), zarówno szczepów saprofitycznych występujących w minimalnie przetworzonych produktach roślinnych oferowanych na rynku spożywczym oraz w odniesieniu do izolatów pałeczek *Salmonella*.

Analizując zakres zrealizowanych badań w kontekście zdefiniowanych hipotez badawczych uważam, że Hipoteza 1 została sformułowana zbyt ogólnie w odniesieniu do wskazania bakterii Gram-ujemnych. Zakres prac obejmował charakterystykę tylko bakterii z rzędu Enterobacterales, które przecież nie są jednymi przedstawicielami pałeczek Gram-ujemnych w łańcuchu żywności. Zatem tylko w odniesieniu do bakterii z rzędu Enterobacterales hipoteza została zweryfikowana. Ponadto w zadaniu badawczym nr 5 powinna być mowa o ocenie skuteczności koktajli bakteriofagowych (nie jednego).

Zwracam w tym miejscu również uwagę, że Norma ISO 22000 definiuje łańcuch żywnościowy jako sekwencję etapów i procesów mających miejsce w produkcji, przetwórstwie, dystrybucji, magazynowaniu i postępowaniu z żywnością oraz jej składnikami, począwszy od produkcji pierwotnej aż do konsumpcji. Wyróżnia się szereg ogniw składających się na łańcuch żywnościowy, począwszy od producentów produktów rolnych, producentów pasz, producentów pierwotnych, przetwórców żywności, kolejnych przetwórców żywności, hurtowników, sprzedawców żywności i innych. Zrealizowane przez Pana mgr inż. Michała Wójcickiego badania miały szeroki zakres, jednakże trochę na wyrost jest stwierdzenie Doktoranta zawarte w Rozdziale 3. na str. 41: „Określiłem skalę problemu występowania szczepów antybiotykoopornych w łańcuchu żywnościowym”, ponieważ zrealizowane badania nie dotyczyły wszystkich ogniw łańcucha żywnościowego. Jest to z mojej strony oczywiście tylko uwaga konstruktywna, aby unikać tego rodzaju uogólnień w przyszłości. W żaden sposób nie umniejszam znaczenia i ogromu zrealizowanych badań.

W kolejnym Rozdziale 4. Materiał doświadczalny i metody badań, Doktorant przedstawił materiał badawczy, a w sposób syntetyczny na pięciu schematach, metody badań odpowiadające poszczególnym zadaniom badawczym, wskazując odpowiadające tym zadaniom publikacje



(publikacje P1, P2, P4, P5). Zadania analityczne były bardzo szerokie, obejmowały wykorzystanie bardzo różnorodnych technik i procedur badawczych, które pozwoliły na:

1. Ocenę jakości mikrobiologicznej minimalnie przetworzonych produktów roślinnych podczas chłodniczego przechowywania;
2. Identyfikację taksonomiczną szczepów bakteryjnych (analiza genetyczna 16S rDNA, profil proteomiczny z wykorzystaniem MALDI-TOF-MS, sekwencjonowanie całych genomów wybranych szczepów bakterii, podtypowanie pałeczek *Salmonella* z wykorzystaniem elektroforezy żelowej w polu pulsacyjnym po cięciu enzymem restrykcyjnym *XbaI*),
3. Serotypowanie pałeczek z rodzaju *Salmonella*,
4. Detekcję genów wirulencji pałeczek *Salmonella*,
5. Badanie fenotypowej wrażliwości wyizolowanych szczepów bakterii na środki przeciwdrobnoustrojowe,
6. Oznaczenie profilu genotypowej oporności na antybiotyki oraz badanie przesiewowe pod kątem wykrywania szczepów wytwarzających  $\beta$ -laktamazy,
7. Izolację, namnażanie i oczyszczanie bakteriofagów, określenie spektrum litycznego dla wyizolowanych bakteriofagów, badanie parametrów fizjologicznych fagów (krzywe jednostopniowego wzrostu, krzywe adsorpcji do komórek bakteryjnych gospodarzy, stałe szybkości adsorpcji);
8. Określenie zmian w kinetyce wzrostu bakteryjnych gospodarzy po infekcji fagowej;
9. Określenie wpływu czynników środowiskowych na zachowanie aktywności bakteriofagów;
10. Określenie morfologii wirionów fagowych;
11. Wyizolowanie genowego DNA bakteriofagów oraz zsekwencjonowanie genomów i ich analizę bioinformatyczną;
12. Aplikację koktajli fagowych na/do minimalnie przetworzone/-ych matryc/-e żywnościowych/-e (metoda natryskowa i wkładka absorpcyjna nasączona biopreparatem);
13. Ocenę skuteczności koktajlu bakteriofagowego w poprawie jakości mikrobiologicznej wybranych minimalnie przetworzonych matryc żywnościowych na podstawie zmian liczby określonych bakterii;
14. Analizę statystyczną uzyskanych wyników badań.

Wskazany zakres oznaczeń podkreśla ogrom wykonanych prac badawczych, umiejętność planowania badań i bardzo dobrą organizację pracy Doktoranta.

Należy tu zaznaczyć także bardzo obszerny materiał biologiczny badań, bowiem wyizolowano 43 bakteriofagi, dla których określano bakteryjnych gospodarzy, zaś 6 wybranych poddano dokładnej charakterystyce genetycznej i morfologicznej (publikacje P1 i P5), a następnie

fagi w postaci koktajli lub wybrane pojedyncze wykorzystano w badaniach oceny skuteczności eliminacji bakterii zanieczyszczających produkty minimalnie przetworzone (razem 7 produktów). Ponadto z żywności minimalnie przetworzonej wyizolowano 43 bakterie saprofityczne, wszystkie poddając identyfikacji taksonomicznej w oparciu o analizę genetyczną i proteomiczną, charakterystyce profili oporności na wybrane antybiotyki oraz określeniu mechanizmów antybiotykoodporności. Podobny zakres analiz dotyczył 54 izolatów pałeczek *Salmonella*.

Reasumując, opracowane przez Doktoranta szczegółowe założenia badawcze i plan badawczy przedstawione w dysertacji, potwierdzają zarówno ogólną wiedzę teoretyczną Pana mgr inż. Michała Wójcickiego w zakresie tematyki rozprawy, jak i umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

W ramach uwag do tej części pracy pragnę wskazać, że bardzo pomocne byłoby zamieszczenie na schematach prezentujących metodykę poszczególnych zadań badawczych bardziej szczegółowych informacji dotyczących materiału biologicznego (np. liczba szczepów bakterii i fagów poddawanych konkretnym analizom), jak i nazw minimalnie przetworzonych produktów roślinnych. Bardzo pomocne byłoby także wskazanie parametrów doświadczeń, tj. warunków przechowywania minimalnie przetworzonych produktów roślinnych, czy też czasu działania czynników fizycznych na bakteriofagi w procedurze określającej ich aktywność i stabilność. Czytelnik musi w tym zakresie odnosić się do wyjaśnień znajdujących się w załączonych publikacjach P2 i P5, co jest trochę uciążliwe.

Analiza zaprezentowanej w rozprawie metodyki badań nasunęła następujące pytania:

1. Dlaczego zdecydowano się na określenie stabilności aktywności bakteriofagów tylko po czasie 1 godziny działania temperatury w zakresie chłodniczego przechowywania. Zastanawiające jest takie podejście ze względu na rzeczywisty czas przechowywania produktów minimalnie przetworzonych. Proszę o wyjaśnienie tej kwestii.
2. Biorąc pod uwagę praktyczne warunki przechowywania produktów minimalnie przetworzonych, zastanawiające jest dlaczego zdecydowano się badać skuteczność bakteriofagów w eliminacji bakterii w produktach takich jak, rukola, mieszanka sałat z marchewką lub burakiem oraz szpinak w czasie przechowywania temperaturze w 20°C. Jednocześnie w przypadku soku marchwiowo-jabłkowego były to dwie temperatury (4°C i 20°C), a dla soku wytworzonego z marchwi, mango i jabłek tylko temp. 4°C. Proszę o wyjaśnienie takiego podejścia.

Omówienie wyników badań przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Michała Wójcickiego oparto na publikacjach P1, P2, P4 oraz P5, stanowiących tematycznie



związany materiał dysertacji. Ta część pracy zawarta została w Rozdziale 5. Omówienie osiągnięć badawczych przedstawionych do oceny. Omówienie wyników przygotowano w podrozdziałach korespondujących z pięcioma celami szczegółowymi pracy, czyli jej zadaniami badawczymi. W podrozdziale 5.1. przedstawiono wyniki dotyczące jakości mikrobiologicznej minimalnie przetworzonych produktów roślinnych wybranych do badań, jak również wyniki szczegółowej identyfikacji i klasyfikacji 43 szczepów bakterii z rzędu *Enterobacterales* wyizolowanych z tych produktów (**publikacja P1**). Przedstawiono ponadto wyniki szczegółowej identyfikacji 54 szczepów pałeczek *Salmonella* zdeponowanych na przestrzeni lat 1981-2019 w kolekcji czystych kultur Instytutu, w którym Doktorant realizował badania. Były to izolaty odzwierzęce, z pomieszczeń do hodowli zwierząt, linii produkcyjnych żywności, z produktów spożywczych, jak również od hospitalizowanych pacjentów (**publikacje P4 oraz P5**). Warte podkreślenia jest to, że w celu potwierdzenia serowarów pałeczek *Salmonella* Doktorant podjął współpracę międzynarodową z Instytutem Pasteura w Paryżu, jednakże raport z tych badań jeszcze nie został przekazany. Wszystkie nowo wyizolowane szczepy bakterii saprofitycznych zdeponowano w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych – Centrum Zasobów Mikrobiologicznych Zakładu Mikrobiologii IBPRS–PIB. Sekwencje regionu genu 16S rDNA wszystkich szczepów wykorzystanych w badaniach oraz dwa kompletne genomy pałeczek *Salmonella* (tj. S.I (6,8:l,-:1,7) KKP 1762 oraz S. Typhimurium KKP 3080) zdeponowano w bazie danych GenBank.

W podrozdziale 5.2. omówiono syntetycznie wyniki badań nad określeniem profili oporności na wybrane antybiotyki oraz mechanizmów antybiotykooporności bakterii z rzędu *Enterobacterales* wyizolowanych lub charakteryzowanych przez Doktoranta. W **publikacji P3** Doktorant podsumował aktualny stan wiedzy dotyczący molekularnych mechanizmów kontrolujących ekspresję genów związanych antybiotykoopornością pałeczek z rodzaju *Salmonella*. W **publikacji P4** przedstawiono natomiast wyniki badań własnych nad określeniem profili oporności na antybiotyki wśród autochtonicznych szczepów pałeczek z rodzaju *Salmonella* wyizolowanych na przestrzeni lat z różnych ogniw łańcucha żywnościowego. Określono profil fenotypowej oporności na dwadzieścia osiem środków przeciwdrobnoustrojowych należących do ośmiu różnych klas antybiotyków, wykrywając szczepy wielolekooporne. Przedstawiono także wyniki analizy genotypowego profilu oporności. Doktorant przedstawił ponadto wyniki poszukiwania w genomach badanych szczepów *Salmonella* genów związanych z patogennością oraz obecnością głównych mechanizmów oporności na  $\beta$ -laktamy. Fenotypową oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe omówiono także na podstawie wyników otrzymanych dla panelu szczepów bakterii saprofitycznych (**publikacja P2**).

Wyniki uzyskane w ramach wskazanych wyżej zadań badawczych pozwoliły Doktorantowi na potwierdzenie pierwszej hipotezy badawczej w odniesieniu do bakterii Gram-ujemnych z rzędu z rzędu Enterobacterales.

Na podstawie wyników pierwszych dwóch zadań badawczych podjęto próbę izolacji bakteriofagów przeciwko dominującym w badanych produktach bakteriom z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz charakteryzowanym pałeczkom *Salmonella*, opornym na antybiotyki. W podrozdziale 5.3. Określenie aktywności wyizolowanych bakteriofagów oraz zakresu bakteryjnych gospodarzy omówiono wyniki charakterystyki bakteriofagów specyficznych wobec 43 bakterii saprofitycznych pochodzących z żywności minimalnie przetworzonej pochodzenia roślinnego (**publikacja P2**). Przedstawiono wyniki wszystkich bakteryjnych gospodarzy dla fagów, miana poszczególnych lizatów fagowych, wygląd tworzonych przez nie łysek, uśrednione wyniki zmian gęstości optycznej mikrohodowli bakterii z bakteriofagami przy dwóch współczynnikach infekcji oraz współczynnik właściwej szybkości wzrostu ( $\mu$ ) zainfekowanych szczepów bakteryjnych gospodarzy w porównaniu z hodowlami kontrolnymi. Dla czterech wytypowanych bakteriofagów wskazano spektrum lityczne oraz wyniki wpływu czynników środowiskowych (pH, temperatura, UV) na ich aktywność lityczną (**publikacja P1**, poza wynikami dla działania UV). Zaprezentowano i omówiono wyniki uzyskane w odniesieniu do aktywności wyizolowanych bakteriofagów specyficznych wobec dwóch wielolekoopornych szczepów *Salmonella*. Wyniki dotyczą także spektrum litycznego, jednoetapowych krzywych wzrostu fagów (wskazanie okresu latencji i wielkości wyrzutu), stałych szybkości adsorpcji  $k$  i współczynników adsorpcji, kinetyki wzrostu dla bakteryjnych gospodarzy przy szerokim zakresie współczynników infekcji oraz wpływu temperatury, pH i UV na aktywność dwóch badanych fagów bakterii *Salmonella*.

W podrozdziale 5.4 Analiza morfologiczna i charakterystyka genomiczna wytypowanych bakteriofagów przedstawiono omówienie wyników opublikowanych w **publikacji P1**, które dotyczą dokładnej charakterystyki *Enterobacter* phage KKP 3262, *Serratia* phage KKP 3264, *Citrobacter* phage KKP 3664 i *Enterobacter* phage KKP 3263 oraz *Salmonella* phage KKP 3829 i *Salmonella* phage KKP 3830 (**publikacja P5**). Wyniki te dotyczą morfologii opisanej z wykorzystaniem obrazowania w transmisyjnym mikroskopie elektronowym oraz poznanej przez Doktoranta sekwencji pełnych genomów wskazanych bakteriofagów. Genomy badanych fagów zdeponowano pod numerami akcesyjnymi OK210076, OK210074, OK210077 oraz OK210075 odpowiednio dla *Enterobacter* phage KKP 3262, *Enterobacter* phage KKP 3263, *Serratia* phage KKP 3264 oraz *Citrobacter* phage KKP 3664 oraz OQ674105 dla *Salmonella* phage KKP 3829 i OQ674106 dla *Salmonella* phage KKP 3830. Bardzo ciekawe są wyniki badań genetycznych wskazanych fagów w zakresie występowania wielu genów kodujących białka hipotetyczne, czyli o nieznannej funkcji. Uzyskane przez Pana mgr inż. Michała Wójcickiego wyniki badań podkreślają zasadność



i ogromną potrzebę realizacji badań genetycznych nad bakteriofagami, również w kontekście bezpieczeństwa ich stosowania.

Podrozdział 5.5. poświęcono przedstawieniu i omówieniu wyników z zakresu oceny skuteczności koktajli bakteriofagowych w poprawie jakości mikrobiologicznej wybranych minimalnie przetworzonych matryc żywnościowych. Wyniki dotyczą oceny skuteczności koktajlu fagowego (składającego się ze wszystkich 43 wyizolowanych bakteriofagów specyficznych wobec bakterii saprofitycznych) do redukcji ogólnej liczby bakterii – **publikacja P2**. Następnie omówiono i przedyskutowano wyniki dotyczące skuteczność pojedynczych fagów oraz czterofagowego koktajlu ukierunkowanego na eliminację pałeczek z rodzaju *Salmonella* na przykładzie dwóch rodzajach soków minimalnie przetworzonych: marchwiowo-mango-jabłkowym utrwalanym HHP (przy 600 MPa) oraz surowym soku marchwiowo-jabłkowym (**publikacja P5**). Rozdział Autor kończy rozważaniami na temat konieczności kontynuacji podjętych badań, wskazując jakie działania badawcze powinny być jeszcze podjęte.

Uzyskane przez Doktoranta wyniki w ramach zadań badawczych 3, 4 oraz 5 pozwoliły potwierdzić drugą hipotezę badawczą wskazującą, że bakteriofagi lityczne o szerokim zakresie bakteryjnych gospodarzy są skuteczną metodą biokontroli bakterii saprofitycznych i patogennych, w tym wielolekoopornych, w środowisku żywności.

Podczas czytania omówienia wyników badań ocenianej rozprawy nasunęły się następujące uwagi i pytania:

1. W podrozdziale 5.1 Genetyczna identyfikacja i klasyfikacja wybranych szczepów bakterii z rzędu Enterobacterales wyizolowanych z łańcucha żywnościowego, na podstawie publikacji P4 wskazano, że dla siedmiu szczepów *Salmonella* nie uzyskano wzoru restrykcyjnego stosując elektroforezę żelową w pulsacyjnym polu. Zgodnie z metodyką badań w procedurze PFGE zastosowano enzym XbaI. Rodzi się tu pytanie, czy sprawdzano wzory dla innych enzymów restrykcyjnych zalecanych dla bakterii *Salmonella*, np. BlnI/AvrII i SpeI?
2. W odczuciu recenzentki trochę dyskusyjne jest stwierdzenie zawarte na stronach 49-50 (podrozdział 5.1) w postaci: „Analiza MALDI-TOF-MS w przypadku kilku szczepów zaklasyfikowała je do poziomu rodzaju, co mogło mieć związek z technologią przetwarzania żywności (np. podczas obróbki produktów spożywczych komórki bakteryjne mogą zostać uszkodzone, co wpływa na wynik identyfikacji na podstawie profili białkowych). Pytanie, z jakiej bazy proteomicznej korzystano w przypadku analizy MALDI-TOF-MS (nie podano tej informacji w metodyce badań). Być może jej ograniczenie spowodowało niedostateczną identyfikację analizowanych bakterii.
3. W opisie rysunku 2 w publikacji P1 wkradł się błąd, bowiem wskazano inną długość fali pomiarów gęstości optycznej hodowli bakterii w porównaniu z opisem metodyki badań.

4. W podrozdziale 5.5 (str. 65) Doktorant wskazuje, że: „Zastosowany koktajl fagowy działał w różnym stopniu, w zależności od metody aplikacji i matrycy żywnościowej”. Stwierdzenie to należałoby uzupełnić o wpływ czasu przechowywania prób, szczególnie w kontekście metod aplikacji koktajlu fagowego.
5. W podrozdziale 5.5 (str. 65), jak również w publikacji P2, Doktorant wskazuje, że: „Zastosowanie koktajlu fagowego do mieszanki sałat z marchewką istotnie zredukowało poziom ogólnej liczby bakterii dopiero po 48h, przy czym wkładka absorpcyjna ograniczyła wzrost bakterii w produkcie skuteczniej niż natrysk.”. Analizując wyniki zamieszczone w tabeli 6 w publikacji P2 nie można się jednak zgodzić ze stwierdzeniem, że sposób aplikacji miał wpływ na skuteczność działania preparatu bakteriofagowego. Dla wszystkich analizowanych produktów po 48h przechowywania prób brak jest istotnych statystycznie różnic między wynikami z obu sposobów aplikacji koktajlu. Zatem również w przypadku mieszanki sałat z burakiem nie powinno paść stwierdzenie, że bezpośredni natrysk w porównaniu do wkładki absorpcyjnej skuteczniej ograniczył wzrost bakterii w produkcie. Natomiast taką różnicę można zauważyć po krótszym czasie przechowywania, np. rukoli (po 24h), czy szpinaku niemytego (po 6h).
6. W odniesieniu do braku skuteczności koktajlu w biokontroli mikroflory szpinaku mytego oraz niemytego, rodzi się pytanie, czy na nieuzyskanie redukcji ogólnej liczby bakterii mógł mieć także wpływ skład chemiczny surowca?

Zasadniczą część rozprawy zamyka Rozdział 6. Stwierdzenia i wnioski, w którym przywołano główny cel badań i odniesiono się do postawionych hipotez badawczych. W rozdziale zawarto 10 punktów prezentujących wynikające z przeprowadzonych badań konkluzje, skorelowane z celem pracy i szczegółowym jej zakresem.

#### Do najważniejszych osiągnięć ocenianej pracy można zaliczyć:

1. Dokonanie szczegółowej charakterystyki genetycznej zakończonej uzyskaniem sekwencji pełnych genomów bakteriofagów *Enterobacter* phage KKP 3262 (vB\_Ecl-IAFB3262), *Enterobacter* phage KKP 3263 (vB\_Elu-IAFB3263), *Serratia* phage KKP 3264 (vB\_Sfo-IAFB3264), *Citrobacter* phage KKP 3664 (vB\_Cfr-IAFB3664), *Salmonella* phage KKP 3829 oraz *Salmonella* phage KKP 3830, charakterystykę morfologiczną oraz charakterystykę zjadliwości tych fagów, przy wskazaniu braku możliwych czynników wirulencji badanych bakteriofagów (w świetle aktualnej wiedzy).
2. Dokładną charakterystykę taksonomiczną opartą na badaniach genetycznych i proteomicznych łącznie 97 szczepów bakterii z rzędu Enterobacterales wyizolowanych z łańcucha produkcji żywności, zakończoną zdeponowaniem w bazie danych GenBank sekwencji regionu genu 16S rDNA wszystkich szczepów oraz dwóch kompletnych genomów pałeczek *Salmonella* S.I (6,8:l,-:1,7) KKP 1762 oraz *S. Typhimurium* KKP 3080.





3. Określenie profili fenotypowej oporności na dwadzieścia osiem środków przeciwdrobnoustrojowych należących do ośmiu różnych klas antybiotyków, dla 97 szczepów bakterii z rzędu Enterobacterales wyizolowanych z łańcucha produkcji żywności, co zakończyło się wskazaniem występowania szczepów wielolekoopornych wśród pałeczek *Salmonella* oraz bakterii saprofitycznych.
4. Opracowanie koktajli fagowych ograniczających rozwój badanych bakterii saprofitycznych oraz *Salmonella* w testowanych produktach roślinnych o minimalnym stopniu przetworzenia.

Podsumowując część pracy doktorskiej Pana mgr inż. Michała Wójcickiego prezentującej uzyskane wyniki, należy podkreślić raz jeszcze, że Autor rozprawy doktorskiej podjął ważne i aktualne badania, związane z dokładnym poznaniem biologii wyizolowanych bakteriofagów, ich aktywnością lityczną oraz możliwością wykorzystania w biokontroli mikroflory zanieczyszczającej produkty roślinne o minimalnym stopniu przetworzenia, ze szczególnym uwzględnieniem bakterii wielolekoopornych. **Zrealizowane badania zakończyły się uzyskaniem interesujących wyników. Stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, ale również praktycznego z zakresu kształtowania jakości i bezpieczeństwa żywności. Wyniki tych badań mogą stać się w przyszłości podstawą innowacyjnego rozwiązania w praktyce przemysłowej, co niewątpliwie wymaga jeszcze kontynuacji badań, szczególnie w zakresie optymalizacji aktywności preparatów fagowych i oceny bezpieczeństwa ich stosowania.**

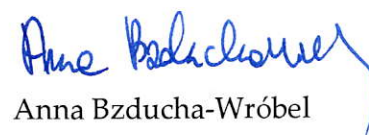
#### Podsumowanie wraz z konkluzją końcową oceny

Recenzowana rozprawa mgr inż. Michała Wójcickiego, zatytułowana „Wykorzystanie potencjału bakteriofagów w biokontroli wybranych bakterii z rzędu Enterobacterales występujących w łańcuchu żywnościowym”, wykonana w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowym Instytucie Badawczym w Warszawie pod kierunkiem dr hab. Edyty Juszczuk-Kubiak, prof. IBPRS-PIB oraz dr hab. inż. Barbary Sokołowskiej, prof. IBPRS-PI stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego.

Wszystkie zaplanowane przez Autora zadania badawcze zostały zrealizowane. Zarówno rezultaty doświadczeń, jak i wynikające z nich wnioski są innowacyjne i mają znaczenie praktyczne. Autor wykazał się samodzielnością i umiejętnością podjęcia i interpretacji zadań badawczych, wpisując swoje osiągnięcie badawcze i naukowe w aktualne trendy w zakresie technologii żywności i żywienia. Jednocześnie, zakres i sposób przeprowadzonych badań dowodzi ogólnej wiedzy teoretycznej doktoranta, świadczy o wyjątkowej umiejętności Pana mgr inż. Michała Wójcickiego do planowania i przeprowadzenia eksperymentów, ich interpretacji i dyskusji naukowej na światowym poziomie, co pozwoliło na merytoryczne wnioskowanie.

W mojej ocenie przedstawiona do recenzji dysertacja odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim na stopień naukowy doktora. W związku z powyższym przedkładam Radzie Naukowej Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie wniosek o jej przyjęcie i dopuszczenie Autora do publicznej obrony.

Ponadto, biorąc pod uwagę kompleksowość i szeroki zakres badań, ich interdyscyplinarność, dominujący udział Pana mgr inż. Michała Wójcickiego w ich realizacji, jakość uzyskanych wyników, znaczenie naukowe i praktyczne oraz rozpowszechnienie wyników badań w wysoko punktowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym i wysokim współczynniku oddziaływania, **przedkładam wniosek formalny do Rady Naukowej Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie o wyróżnienie pracy doktorskiej Pana mgr inż. Michała Wójcickiego.**

  
Anna Bzducha-Wróbel