

Prof. dr hab. Tomasz Sakowski

Zakład Biotechnologii i Nutrigenomiki

Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN w Jastrzębcu

05-552 Magdalenka

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Kot

pt.: „**Ocena *in vitro* przeciwdrobnoustrojowych właściwości nanomateriałów w profilaktyce mastitis oraz kulawizn na tle zakażeń bakteryjno – grzybiczych**”
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Marcina Gołębińskiego i dr inż. Aleksandry Kalińskiej jako promotora pomocniczego.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Magdaleny Kot podejmuje się rozwiązania niezmiernie istotnego, z punktu widzenia hodowcy, problemu terapii zapalenia wymienia i kulawizn u krów mlecznych spowodowanych przez działanie na organizm zwierzęcy chorobotwórczej mikroflory bakteryjnej i grzybów. Prowadzona od ponad 50 lat jednostronna selekcja była w kierunku poprawy użytkowości mlecznej doprowadziła, między innymi, do pogorszenia się cech zdrowotnych krów mlecznych. Kulawizny oprócz infekcji bakteryjnych w obrębie skóry palców i piętek nóg, mogą być spowodowane mechanicznym uszkodzeniem racic lub skaleczeniami, czy wręcz uszkodzeniem całych kończyn. Obie choroby mają negatywny wpływ nie tylko na zdrowie zwierzęcia, ale również są przyczyną spadku wydajności mlecznej i pogorszenia się jego dobrostanu. Leczenie mastitis i kulawizn jest długotrwałe i uciążliwe, co również jest źródłem dodatkowych strat w gospodarstwie.

W chowach bydła mlecznego od dłuższego czasu obserwuje się nadmierne wykorzystywanie antybiotyków w terapii tych dwóch chorób, co niestety jest przyczyną powstawania antybiotykoodpornych szczepów bakteryjnych. Obecnie jest to na tyle palący problem, że dotyczy on również społeczeństwa mieszkającego na wsi. Dostępne publikacje naukowe potwierdzają fakt, że w miejscach o intensywnej produkcji zwierzęcej stosuje się silniejszą terapię antybiotykową w leczeniu chorób u ludzi, niż w podobnych przypadkach w mieście. Dlatego obecna hodowla zwierząt coraz silniej selekcjonuje zwierzęta w kierunku odporności i lepszego przystosowania do warunków bytowych. Selekcja w kierunku wzrostu wydajności mlecznej przestała być celem samym w sobie. Innym rozwiązaniem tego problemu jest ukierunkowanie badań na poszukiwanie markerów genetycznych oraz alternatywnych procedur terapeutycznych, szczególnie w przypadku wystąpienia formy podklinicznej mastitis oraz kulawizny.

Skłonność krów do zapaleń wymienia uwarunkowana jest nie tylko genetycznie. Ma ona również silne podłoże środowiskowe związane z jakością żywienia i utrzymania zwierząt, jak również z techniką i higieną doju. To samo dotyczy częstotliwości występowania kulawizn. W toku prowadzonej selekcji rama ciała krowy znacznie się

powiększyła i tym samym wzrosła też jej masa, która niekorzystnie oddziałuje na cechy motoryczne zwierzęcia a tym samym na stan racic, które wymagają częstej korekcji i stosowania roztworów wzmacniających ich twardość. Z korytarzy przepędowych i z miejsc przebywania bydła powinno usuwać się wszelkie przedmioty mogące ranić nogi zwierząt. Obecnie, w dobrze prowadzonych stadach, krowy chodzące na pastwisko poruszają się po specjalnie wyznaczonych drogach o miękkim podłożu.

Zmiany wag w indeksach selekcyjnych czy profilaktyka stosowana w chowach krów mlecznych poprawia stan zdrowotny kolejnych pokoleń zwierząt i powoli przedłuża wiek średniego użytkowania krów w stadzie. Walka o obniżenie zużycia antybiotyków w chowach zwierząt i zastąpienie ich innymi metodami terapeutycznymi w leczeniu podklinicznych stanów zapalenia i kulawizn nie jest jeszcze zakończona. W tym sensie praca doktorantki mgr inż. Magdaleny Kot wychodzi na przeciw oczekiwaniom hodowców bydła i wnosi nowe spojrzenie na walkę z patogenną mikroflorą poprzez zastosowanie w terapii nanomateriałów. Nanomateriały a zwłaszcza cząstki zawierające srebro, złoto lub miedź oraz ich kompleksy wykazują duży zakres właściwości biobójczych ze szczególnym uwzględnieniem działań przeciwgrzybiczych, przeciwwirusowych i przeciwpasożytniczych.

Charakterystyka pracy

Na 72 stronach maszynopisu znajdziemy obszerny wstęp opisujący tło prowadzonych badań, hipotezy badawcze, cel i zakres pracy, materiał i metody badawcze wraz z opisem przeprowadzonych analiz zebranego materiału, wyniki i ich omówienie oraz wnioski końcowe będące podsumowaniem prac eksperymentalnych. Pozostałą część pracy tworzy zbiór czterech publikacji naukowych wraz z oświadczeniami współautorów o ich udziale w powstaniu dzieła, będący załącznikiem do pracy doktorskiej.

Zbiór publikacji naukowych wchodzących w skład dysertacji doktorskiej stanowią następujące pozycje:

- 1. Kot, M.**; Kalińska, A.; Jaworski, S.; Wierzbicki, M.; Smulski, S.; Gołębiowski, M. *In Vitro Studies of Nanoparticles as a Potentially New Antimicrobial Agent for the Prevention and Treatment of Lameness and Digital Dermatitis in Cattle. Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 6146. **IF= 4,9; 140 pkt.**
- 2. Wierzbicki M, Kot M, Lange A, Kalińska A, Gołębiowski M, Jaworski S.** Evaluation of the Antimicrobial, Cytotoxic, and Physical Properties of Selected Nano - Complexes in Bovine Udder Inflammatory Pathogen Control. *Nanotechnol Sci Appl.* 2024, 17, 77 - 94. **IF= 2,4; 200 pkt.**
- 3. Kot, M.**; Lange, A.; Jabłońska, W.; Kalińska, A.; Nasitowska, B.; Skrzeczanowski, W.; Gołębiowski, M. Nanoparticles as New Antifungals in the Prevention of Bovine Mycotic Mastitis Caused by *Candida* spp. and *Diutina* spp. - *In Vitro Studies. Molecules* 2025, 30, 2086. **IF= 4,6; 140 pkt.**

4. Kot, M.; Jabłońska, W.M.; Lange, A.; Kalińska, A.; Gołębiowski, M. Nanomaterials in the Management of Fungal Udder Inflammation in Cattle as an Effective Preventive Strategy Based on *In Vitro* Studies. *Biology* 2026, 15, 412. **IF= 3,5; 100 pkt.**

Łączny Impact Factor czterech publikacji stanowiących załącznik do rozprawy doktorskiej wynosi **IF = 15,4 i 580 pkt** na podstawie klasyfikacji czasopism naukowych MNiSW. Należy przy tym podkreślić, że doktorantka w trzech publikacjach była pierwszym autorem a w jednej drugim, co świadczy o docenieniu jej pracy badawczej przez współautorów.

W obszernym wprowadzeniu do przeprowadzonych badań doktorantka mgr inż. Magdalena Kot omówiła problemy występujące w hodowli bydła opisując kulawizny i mastitis jako najczęściej występujące choroby w stadach bydła mlecznego, wymagające ciągłych interwencji weterynaryjnych. Według wielu badaczy należą one do najbardziej kosztownych schorzeń. Zarówno mastitis jak i kulawizny mają podłoże drobnoustrojowe prowadzące do powstawania ropni i wrzodów a w przypadku mastitis do szybkiego namnożenia szkodliwej mikroflory bakteryjnej i wzrostu liczby komórek somatycznych w mleku. Mleko z LKS powyżej 400 000/ml traktowane jest jako pozaklasowe i z reguły powinno być przeznaczone do utylizacji bez możliwości sprzedaży. Bakteryjne podłoże tych chorób jest przyczyną stosowania w ich terapii coraz intensywniejszych kuracji antybiotykowych, co prowadzi wprost do powstawania antybiotykoodpornych szczepów bakterii. Uniemożliwia to prowadzenie skutecznego leczenia i jest przyczyną szybszej eliminacji chorych krów ze stada.

Skoro antybiotyki wykorzystywane w terapiach są coraz mniej skuteczne, a ich nadmierne stosowanie zagraża również środowisku i populacji ludzkiej, należy poszukiwać alternatywnych rozwiązań zwalczających chorobotwórcze patogeny i grzyby, będące przyczyną mastitis i kulawizn.

W tym celu mgr inż. Magdalena Kot postawiła pięć hipotez badawczych, na które odpowiedź miały dać przeprowadzone badania. Ujmując je w skrócie poszukiwano odpowiedzi na pytania czy nanocząstki metali wykazują istotne właściwości antibakteryjne i antygrzybicze, czy będą skuteczne w zwalczaniu patogenów i w jaki sposób terapia zależna będzie od rodzaju zastosowanego nanomateriału. Założono również, że kompleksy bimetaliczne mogą wykazywać efekt synergistyczny i przez to silniejsze działanie biobójcze, co może być alternatywą dla nieskutecznych chemioterapeutyków. Ostatnią założoną hipotezą badawczą było zbadanie toksyczności wpływu różnych stężeń nanocząstek metali na przeżywalność komórek ludzkich i bydłych.

Celem przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej było przeprowadzenie oceny *in vitro* przeciwustrojowych właściwości nanomateriałów oraz ich kompleksów jako potencjalnych nie antybiotykowych środków do zastosowania w profilaktyce mastitis i kulawizn bydła, których przyczyną są zakażenia bakteryjne i grzybicze.

Opisany przez doktorantkę wstęp i uzasadnienie podjętych badań, ich cel i zakres zmierzający do potwierdzenia założonych hipotez badawczych nie budzą zastrzeżeń recenzenta.

W rozdziale materiał i metody omówiono materiał badawczy w podziale na załączone do pracy doktorskiej publikacje. Badano aktywność przeciwestrojącą nanocząstek 5 metali oraz wybranych nanokompleksów wobec patogenów izolowanych od bydła ze zdiagnozowanym mastitis i kulawiznami. Były to hydrokoloidy AgNPs, AuNPs, CuNPs i PtNPs. natomiast FeNPs użyto w formie proszku. Poszukując efektu synergistycznego w aktywności przeciwbakteryjnej porównywano skuteczność pojedynczych nanocząstek z nanokompleksami. Kompleksy NPs powstały poprzez połączenie dwóch rodzajów NPs w stosunku 1:1. Dalszym celem badań była ocena cytotoksyczności oraz wskazanie tych nanomateriałów, które mają największy potencjał do badań in vivo i wdrożeniowych.

Zebrany materiał biologiczny obejmował próbki tkanek, ropną wydzielinę z pęcherzy, ropę z domieszką krwi oraz różnego rodzaju wymazy pobrane od bydła rasy polskiej holsztyńsko - fryzyjskiej, u których zdiagnozowano kulawizny. Próbkę te pozyskano w trakcie rutynowej korekcji racic. Z pobranego materiału biologicznego izolowano mikroorganizmy które następnie poddawano dalszym analizom. Próbkę mleka ćwiartkowego pochodziły od krów z podklinicznym zapaleniem wymienia (LKS >200 000/ml). Z pobranego mleka izolowano mikroorganizmy do dalszych badań. Komórki nabłonka gruczołu mlekowego bydła BME - UV1 zostały zakupione w banku komórek Instytutu Zooprofilaktycznego Lombardii i Emilii – Romanii (Włochy), natomiast ludzkie komórki HMEC zostały pozyskane od firmy Thermo Fisher Scientific. Zakupione linie komórkowe poddawane były testom cytotoksyczności z wykorzystaniem NPs.

W przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej detalicznie opisano zastosowane metody badawcze od morfologii nanocząstek w celu określenia ich właściwości fizykochemicznych po izolacji mikroorganizmów z materiału biologicznego. Identyfikację mikroorganizmów dokonano w zewnętrznym laboratorium przy użyciu aparatu MALDI - TOF MS oraz urządzenia VITEK 2. Do identyfikacji innych mikroorganizmów wykorzystano również ich obraz mikroskopowy. Wykorzystanie opisanej w metodyce aparatury było istotne ze względu na fakt, że w niektórych przypadkach wyizolowane patogeny nie były wcześniej łączone z mastitis czy kulawizną. Uzyskane wyniki były zatem precyzyjniejsze niż w przypadku standardowej identyfikacji mikrobiologicznej.

Opisana przez doktorantkę metodyka oraz dobór i opracowanie materiału biologicznego również nie budzi zastrzeżeń recenzenta.

Przechodząc do omówienia wyników należy podkreślić, że doktorantka wykonała żmudną pracę laboratoryjną rozpoznając szczepy bakteryjne i grzybicze odpowiedzialne za powstawanie kulawizny lub mastitis i oceniając ich przeżywalność po traktowaniu roztworami nanocząstek o różnych stężeniach. W jej wyniku mgr inż. Magdalena Kot wyizolowała 5 szczepów bakteryjnych, które mogą być odpowiedzialne powstawanie

kulawizny. Jednak, jak sama zaznaczyła, dostępna literatura dotycząca identyfikacji mikroorganizmów związanych z kulawiznami jest uboga. Wyizolowane bakterie nie były wcześniej identyfikowane z kulawiznami. Niemniej przeprowadzone badania wskazują, że przyczyną kulawizn obok uszkodzeń mechanicznych mogą być też zakażenia bakteryjne. AgNPs, AuNPs i CuNPs wykazały najsilniejsze działanie biobójcze wobec badanych mikroorganizmów przy wyższych stężeniach (12,5 - 25 mg/l). W przypadku kompleksów, kompleksem, który wykazał najsilniejsze działanie przeciwbakteryjne był AgCuNPs. W przypadku mastitis z materiału biologicznego wyizolowano z mleka 10 mikroorganizmów. Spośród badanych NPs najsilniejszą aktywność przeciwbakteryjną wykazywał hydrokoloid AgNPs. Dodatkowo Doktorantka wykazała, że nanocząstki, przy tym samym stężeniu 25 mg/l, redukowały przeżywalność patogenów o 86 – 98 %. Natomiast stężenie 12 mg/l AgNPs zastosowane wobec *S. aureus*, pozwoliło na redukcję przeżywalności o 86 %. Spośród kompleksów najsilniejszą aktywność biobójczą wykazywał AgCuNPs, który już przy najniższym stężeniu 0,78 mg/l obniżał przeżywalność patogenów, takich jak *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus sciuri*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* o 95 - 97 %. W zakresie stężeń 6,25 - 12,5 mg/l dla tego kompleksu *S. uberis* wykazywał 0 % przeżywalności, podobnie jak *Serratia marcescens* przy stężeniu 12,5 mg/l. *Citrobacter koseri* charakteryzował się najniższą podatnością przy najniższym badanym stężeniu (0,78 mg/l), jednak nawet w tych warunkach przeżywalność obniżała się o około 60 %. Wyniki analizy przeżywalności grzybów i glonów poddanych działaniu kompleksów NPs były zbliżone do rezultatów uzyskanych dla bakterii.

Przeżywalność komórek BME-UV1 i HMEC oceniono za pomocą testu PrestoBlue HS (Invitrogen, Waltham, MA, USA), określającego aktywność metaboliczną (oksydoredukcyjną) komórek. Wyniki przeżywalności komórkowej po ekspozycji na NPs w stężeniach 0,1; 0,5; 1; 2 i 2,5 mg/l wykazały spadek przeżywalności w obu liniach komórkowych po ekspozycji na CuNPs w stężeniach wyższych niż 0,1 mg/l, podobnie jak w przypadku zastosowanych kompleksów zawierających CuNPs (AgCuNPs, CuPtNPs, AuCuNPs, CuFeNPs).

W przeprowadzonych badaniach wyizolowano i zidentyfikowano takie grzyby jak: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Diutina rugosa* var. *rugosa*, *Diutina catenulata*, *Diutina rugosa*. Spośród badanych NPs, hydrokoloid AgNPs wykazywał zbliżony poziom aktywności biobójczej niezależnie od zastosowanego stężenia, jednak efekt ten był zróżnicowany w zależności od gatunku grzyba. Największą wrażliwość na działanie NPs wykazywały *D.rugosa* oraz *C. albicans*, dla których przeżywalność w całym zakresie badanych stężeń utrzymywała się na poziomie 5 - 7 %. Badania wykazały, że CuNPs miała wyższą aktywność przeciwgrzybiczą w porównaniu do AuNPs, jednak niższą niż AgNPs.

Kompleksy NPs wykazywały efekt synergiczny i charakteryzowały się wyższą aktywnością przeciwgrzybiczą niż pojedyncze NPs, choć w różnym stopniu. AgAuNPs

wykazywał podobną aktywność jak AgNPs, bez wyraźnych zmian przeżywalności w zależności od stężenia. Kompleks AgCuNPs wykazał najwyższą aktywność przeciwgrzybiczą spośród wszystkich badanych NPs i ich kompleksów. W przypadku *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *D. catenulata*, *D. rugosa* oraz *D. rugosa* var. *rugosa* przeżywalność przy najwyższym stężeniu wynosiła około 2 %.

Kontrolnie doktorantka przeprowadziła test dyfuzyjno - krążkowy służący porównaniu wrażliwości grzybów na dostępne leki przeciwgrzybicze. Największą strefę zahamowania wzrostu (40 mm) odnotowano dla *C. parapsilosis* po zastosowaniu preparatu KCA10, natomiast w przypadku CTM10 strefa ta wynosiła 34 mm. Szczep *C. glabrata* po zastosowaniu 1 µg flucytozyny (FY1) wykazywał strefę zahamowania o średnicy 32 mm. Preparat KCA10 wykazywał wysoką skuteczność wobec *D. catenulata* i *D. rugosa*, dla których średnice stref zahamowania wynosiły po 30 mm. Najniższą aktywność przeciwgrzybiczą wykazywał flukonazol 10 µg (FCN10) wobec *C. parapsilosis*, *D. rugosa* oraz *D. catenulata*, dla których nie obserwowano stref zahamowania wzrostu (0 mm). Preparaty reagowały z reguły specyficznie w zależności od gatunku grzybów.

Z próbek mleka doktorantka wyizolowała następujące szczepy grzybów: *Pichia kudriavzevii*, *Wickerhamomyces pararugosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida mucoides*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Candida hoffmannii*, *Kluyveromyces marxianus*. W przypadku mastitis oceniono żywotność grzybów wyizolowanych z mleka poddanych działaniu nanocząstek **Ag, Au, Cu, Pt i FeC**. Najwyższą przeżywalność po ekspozycji na AgNPs obserwowano dla *S.cerevisiae*, gdzie przy stężeniu 25 mg/l wynosiła ona 119 %, a przy 3,125 mg/l również przekraczała wartości obserwowane w kontroli. Dla pozostałych stężeń mieściła się w zakresie 90 - 96 %. AgNPs wykazywały stosunkowo niską aktywność wobec *C. hoffmannii*, dla której przeżywalność wynosiła 50 % przy najwyższym stężeniu oraz 35 % przy najniższym. W przypadku *W. pararugosa* przeżywalność dla stężeń 25 i 1,5 mg/l wynosiła 20 - 26 %. Największą wrażliwość na działanie AgNPs wykazywały *C.mucoides* oraz *W. anomalus*, dla których obserwowano wyraźne obniżenie przeżywalności w całym zakresie badanych stężeń. Dziwi brak skutecznego działania AgNPs. **Czy można to w jakiś sposób wyjaśnić, zwłaszcza że istnieją badania, które nie potwierdzają tego wyniku?**

AuNPs wykazywała niską aktywność przeciwgrzybiczą wobec *S.cerevisiae*. Największą wrażliwość na działanie AgAuNPs wykazywała *P. kudriavzevii*, dla której przeżywalność we wszystkich badanych stężeniach mieściła się w zakresie 5 – 8 %. W przypadku *C. hoffmannii* przeżywalność wynosiła 25 - 35 % w zależności od stężenia. AgCuNPs wykazywał najwyższą aktywność przeciwgrzybiczą spośród badanych kompleksów. W przypadku *P. kudriavzevii* przeżywalność przy najwyższym stężeniu wynosiła około 2 %, natomiast wraz ze spadkiem stężenia obserwowano jej wzrost, osiągający 4 - 7 % przy najniższym stężeniu. *C. hoffmannii*, *W. pararugosa* oraz *K. marxianus* wykazywały przeżywalność w zakresie 5 - 27 % w zależności od stężenia.

Podobnie jak w przypadku pozostałych kompleksów, *S. cerevisiae* wykazywała najniższą podatność na działanie AuCuNPs, utrzymując wyższą przeżywalność w całym zakresie badanych stężeń.

Wnioski

Przeprowadzone przez mgr inż. Magdalenę Kot badania stanowią istotny wkład w poszukiwanie alternatywnych metod zwalczania kulawizny u bydła i mastitis u krów mlecznych. W przedłożonej do recenzji dysertacji doktorantka zbadała właściwości przeciwdrobnoustrojowe NPs wobec mikroorganizmów wyizolowanych z materiału biologicznego pochodzącego od krów z objawami kulawizn. Należy podkreślić, że drobnoustroje te nie były wcześniej jednoznacznie wiązane z jej występowaniem, co znacznie rozszerza aktualny stan wiedzy na temat etiologii tej choroby. Uzyskane wyniki wykazały, że właściwości biobójcze NPs są zależne od ich rodzaju oraz stężenia. Najwyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową wykazały AgNPs oraz CuNPs, które znacząco redukowały przeżywalność badanych patogenów nawet przy stosunkowo niskich stężeniach. PtNPs oraz FeNPs wykazywały bardzo ograniczoną aktywność, a w niektórych przypadkach obserwowano nawet wzrost przeżywalności bakterii, co wyklucza ich zastosowanie terapeutyczne w analizowanym zakresie. Szczególnie istotne było potwierdzenie, że nanokompleksy, w tym przede wszystkim AgCuNPs, wykazują znacznie wyższą skuteczność niż pojedyncze NPs, co potwierdzałoby efekt synergii. Jednocześnie wykazano zróżnicowaną wrażliwość poszczególnych drobnoustrojów, co zdaniem doktorantki może potwierdzać złożony, wieloczynnikowy charakter kulawizn.

W przypadku mastitis badania koncentrowały się na ocenie potencjału NPs jako alternatywy dla antybiotyków w terapii tej choroby u bydła mlecznego. Uzyskane wyniki wykazały, że najwyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową wykazują AgNPs i CuNPs, natomiast AuNPs charakteryzują się umiarkowaną skutecznością. Również i w tym przypadku FeNPs oraz PtNPs wykazywały niewielkie lub brak działania bakteriobójczego. Testowane Nanokompleksy a zwłaszcza AgCuNPs, wykazały znacznie wyższą skuteczność w zwalczaniu patogennej mikroflory niż pojedyncze NPs.

Dokonano również oceny właściwości przeciwgrzybiczych NPs wobec patogenów izolowanych z mleka krów z subklinicznym *mastitis*. Mikroflora grzybicza stanowi istotny problem kliniczny ze względu na rosnącą odporność na standardowe leczenie przeciwgrzybicze. Uzyskane wyniki udowodniły, że AgNPs, CuNPs oraz AuNPs wykazują istotną aktywność przeciwgrzybiczą, przy czym ich skuteczność była zależna od stężenia oraz gatunku mikroorganizmu. NPs, szczególnie w formie kompleksów, mogą stanowić skuteczną alternatywę dla antybiotyków w leczeniu *mastitis*. Jednakże ich zastosowanie w praktyce wymaga dalszych badań, zwłaszcza w warunkach *in vivo*.

Ważnym elementem przeprowadzonych badań była ocena cytotoksyczności NPs wobec komórek BME-UV1 oraz HMEC, w których wykazano, że przy niskich stężeniach

NPs nie wykazują one istotnej toksyczności, co ma kluczowe znaczenie dla ich potencjalnego zastosowania w praktyce.

Zasadniczym wnioskiem wynikającym z przeprowadzonych badań nad zastosowaniem nanocząstek metali szlachetnych jako alternatywy dla antybiotyków stosowanych w terapii kulawizn i mastitis jest potwierdzenie, że mogą one stanowić skuteczną alternatywę dla klasycznych leków przeciwgrzybiczych, zwłaszcza w przypadku szczepów lekoopornych. Dodatkowo uzyskane wyniki potwierdziły lepszą skuteczność nanokompleksu AgCuNPs, w eliminacji patogennej mikroflory bakteryjnej i grzybiczej od pojedynczych NPs. W celu potwierdzenia uzyskanych wyników konieczne będą dalsze badania w warunkach *in vivo*.

Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji praca doktorska składa się z omówienia wyników czterech publikacji naukowych wydanych przez renomowane czasopisma naukowe. Mgr inż. Magdalena Kot przeprowadziła niezwykle szczegółową analizę możliwości zastosowania nanocząstek, głównie srebra i miedzi oraz ich konglomeratu w profilaktyce mastitis i kulawizn u bydła mlecznego. Na uwagę zasługuje starannie przygotowana metodyka przeprowadzonych doświadczeń rozszerzonych o analizę porównawczą z dostępnymi na rynku środkami grzybobójczymi oraz badanie przeżywalności komórek bydlęcych i ludzkich BME-UV1 i HMEC poddanych działaniu NPt i ich konglomeratów. Przeprowadzone badania mają także duże znaczenie praktyczne, zwłaszcza w sytuacji wzrastającej antybiotykoodporności szczepów bakterii w otoczeniu produkcji zwierzęcej. Nie do przecenienia jest również fakt eliminowania antybiotyków z terapii chorób i zastępowanie ich alternatywnymi metodami leczenia. Stąd wniosek, że przeprowadzone badania mają duży potencjał użyteczny w zastosowaniu nanocząstek w profilaktyce i leczeniu mastitis i kulawizn u bydła. Do rozwiązania pozostaje problem opracowania odpowiednich stężeń nanocząstek metali szlachetnych w roztworach przeznaczonych do zwalczania chorobotwórczych mikroorganizmów oraz przeprowadzenie badań nad zawartością pozostałości nanocząstek metali w mleku i określenie długości karencji po zastosowaniu nanocząsteczkowej terapii w leczeniu mastitis. Praca mgr inż. Magdaleny Kot ma również, oprócz niewątpliwego znaczenia praktycznego duże walory poznawcze, zwłaszcza w kwestii mikroflory bakteryjnej i grzybiczej będącej jedną z przyczyn z mastitis i kulawizn. Zwraca uwagę również staranna forma i treść przygotowanego rękopisu popartego obszernym przeglądem literatury liczącym 100 pozycji.

Wniosek końcowy

Oceniając wysoko poziom naukowy i oryginalność uzyskanych wyników stwierdzam, że praca doktorska mgr inż. Magdaleny Kot pt.: „Ocena *in vitro* przeciwdrobnoustrojowych właściwości nanomateriałów w profilaktyce mastitis oraz kulawizn na tle zakażeń bakteryjno – grzybiczych” spełnia wymagania określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r., poz. 1571 z późn. zm.) oraz

Uchwały Nr 89-2022/2023 Senatu SGGW z dnia 26 czerwca 2023 roku w sprawie uchwalenia Regulaminów przeprowadzania postępowań w sprawie nadania stopnia doktora w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Przedkładałam zatem Radzie Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Magdaleny Kot do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Biorąc pod uwagę aplikacyjny charakter badań i zastosowane metody badawcze, wymagające posiadania wiedzy z zakresu mikrobiologii, nanotechnologii oraz obsługi precyzyjnego sprzętu laboratoryjnego, której wyrazem są załączone do pracy doktorskiej publikacje naukowe, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy przez Radę Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie stosowną nagrodą.

Prof. dr hab. Tadeusz Szałowski

INSTYTUT GENETYKI I BIOTECHNOLOGII ZWIERZĄT
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
JASTRZĘBIEC KIW-wy, ul. Postępu 36A
05-552 MAGDALENKA
Tel. +48 22 736 70 00
REGON: 000326196, NIP: 123-00-18-381

"POLECONY"

R (00)859007734368214812

2025

Poczta Polska	zł	—	gr
Opłata pobrana			

KANCELARIA GŁÓWNA SGGW
2026 -08- 10
WPLYNĘŁO DNIA -5-



OPLATA POBRANA
TAXE PERÇUE – POLOGNE
umowa z Poczta Polska S.A.
ID nr 429867/W



✓ BIURO OBSŁUGI NAUKI

SZKOŁA GŁÓWNA GOSPODARSTWA WIEJSKIEGO

W WARSZAWIE

UL. NOWOURSYNOWSKA 166

02-787 WARSZAWA

Bud. 2

RECEPZA