Dr hab. Magdalena Płotka, prof. UG
Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański
e-mail: magdalena.plotka@ug.edu.pl
tel.: +48 58 523 60 75

Gdańsk, 02.11.2026 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR AHMER BIN HAFEEZA ZATYTUŁOWANEJ: „Potencjał Farmakologiczny Mikrobioty Produktów Pszczelich"

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Ahmera Bin Hafeeza została wykonana pod kierunkiem dr hab. inż. Piotra Szwedy, prof. PG w Katedrze Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej. Praca została wykonana w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki OPUS UMO-2021/41/B/NZ9/03929 pt. „Potencjał biotechnologiczny i farmakologiczny mikrobioty produktów pszczelich", którego kierownikiem był dr hab. inż. Piotra Szweda, prof. PG.

Rezultaty przedstawionych badań zostały opublikowane w pięciu recenzowanych artykułach naukowych w czasopismach: Applied Microbiology and Biotechnology, Probiotics and Antimicrobial Proteins, International Journal of Molecular Sciences, ACS Omega oraz Molecular Genetics and Genomics w latach 2023-2026. W czterech z prezentowanych publikacji mgr Ahmer Bin Hafeez jest pierwszym, wiodącym autorem. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (Impact factor) przedstawionych prac jest wysoki i wynosi 20.0. Wkład Doktoranta w powstanie każdej z prac nie budzi wątpliwości.

Rozprawę doktorską rozpoczyna Streszczenie w j. polskim i j. angielskim, obszerny Wstęp oraz lista używanych skrótów. Spis treści ułatwia sprawne poruszanie się pomiędzy rozdziałami. Każda z zamieszczonych pięciu publikacji dodatkowo poprzedzona jest krótkim nakreśleniem problemu badawczego, opisem wyników pracy i jej konkluzjami. Przyjęty układ rozprawy oceniam bardzo pozytywnie, ponieważ umożliwia bezpośrednie odniesienie zwięzłego omówienia do treści danej publikacji i ułatwia skupienie uwagi na poszczególnych pracach. W mojej ocenie jest to rozwiązanie bardziej przejrzyste niż przykładowo zbiorcze przedstawienie wszystkich badań i zamieszczenie publikacji na końcu rozprawy w formie załączników. Rozprawę zamyka Rozdział 3 – opis nieopublikowanych danych badawczych, a następnie Rozdział 4 zawierający podsumowanie. W mojej ocenie całość jest bardzo spójnie i klarownie przedstawiona. Doktorant posiada odpowiednią wiedzę w swojej dyscyplinie, zna aktualny stan badań, rozumie stosowane metody i potrafi krytycznie analizować literaturę naukową.

Omówienie merytorycznych elementów rozprawy doktorskiej

Nakreślenie problemu badawczego przez mgr Ahmera Bin Hafeeza nie mogło być bardziej wymowne. Wystarczy wspomnieć, że w latach 2000-2020 tylko 27 nowych antybiotyków zostało wprowadzonych do komercyjnego użycia, w porównaniu do lat wcześniejszych (1928-1970), gdzie było ich 270. Łącząc te fakty z narastającą opornością bakterii na antybiotyki, zwalczanie lekoopornych patogenów jawi się jako problem globalny, a naukowcy starają się sprostać wyzwaniu wprowadzając na rynek nowe substancje antybiotykowe lub zastępując je zamiennikami o przeciwbakteryjnym działaniu.

Mgr Ahmer Bin Hafeez klasyfikuje kategorie oporności bakterii na antybiotyki dzieląc je na oporność wrodzoną, nabytą oraz adaptacyjną. Dobrze wprowadza czytelnika w zgłębiane zagadnienie naukowe, w czym pomagają również świetnie przygotowane Figury. Duży nacisk kładzie na opis bakterii z grupy ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* spp.), na opis mechanizmów

oporności i technik zwalczania tych patogenów. Doktorant zwraca uwagę na rolę produktów naturalnych, w tym produktów pszczelich jako źródła pozyskiwania nowych związków antybakteryjnych.

To właśnie analiza mikrobioty trzech produktów pszczelich: miodu, pyłku oraz pierzgi pod kątem ich potencjału przeciwdrobnoustrojowego była głównym celem przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej.

Pierwsza z ocenianych prac dotyczy wstępnej charakterystyki 132 izolatów bakterii uzyskanych z trzech próbek miodu pobranych z pasiek w Sulminie (województwo pomorskie). Część z nich przebadano pod kątem hamowania wzrostu *Staphylococcus aureus*. Do sekwencjonowania całych genomów wybrano trzy obiecujące szczepy: dwa *Bacillus paralicheniformis* (SZA14 i SZA16) oraz jeden *Bacillus subtilis* (SZB3).

Analiza genomów ujawniła potencjał izolatów do produkcji wielu metabolitów, m.in. lichenizyny, fengycyny, bacytracyny i subtilozyny A. Dodatkowo autorzy wytypowali krótkie sekwencje o przewidywanej aktywności przeciwdrobnoustrojowej: osiem w SZA14, dwanaście w SZA16 i dziewięć w SZB3. Wiodący wkład mgr Ahmera Bin Hafeeza w powstanie publikacji nie budzi zastrzeżeń. Wykonał wstępne analizy szczepów pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej, sekwencjonowanie oraz anotację genomów czy modelowanie homologiczne potencjalnych peptydów antybakteryjnych. Był odpowiedzialny za interpretację danych i przygotowanie manuskryptu. Autorzy wraz z mgr Ahmerem Bin Hafeezem potwierdzili zatem prozdrowotne właściwości miodu i zawartych w nim komórek *Bacillus* spp. **Ponieważ publikacja była w głównej mierze oparta na analizach *in silico*, chciałabym zapytać mgr Ahmera Bin Hafeeza jakie prace doświadczalne zaproponowałby jako kontynuacja podjętych prac teoretycznych?**

Druga z cyklu prac zawiera znacznie bardziej rozbudowaną część eksperymentalną, choć zgodnie z oświadczeniem Doktoranta brał on głównie udział w sekwencjonowaniu genomów oraz analizie bioinformatycznej. Wygenerowane dane wspierają jednak i dobrze uzupełniają badania doświadczalne. To czego brakowało w pierwszej z publikacji to testowanie izolatów bakterii z miodu pod kątem hamowania wzrostu większej niż tylko *S. aureus* liczby gatunków bakterii.

W pracy "Probiotic Potential of *Bacillus* Isolates from Polish Bee Pollen and Bee Bread Probiotics and Antimicrobial Proteins" mgr Ahmer Bin Hafeez wraz z współautorami ocenili potencjał probiotyczny 10 szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus* wyizolowanych z pyłku pszczelego i pierzgi. Przykładowo 8 z 10 izolatów hamowało wzrost bakterii Gram-ujemnej *Pseudomonas aeruginosa*, a bakterią najbardziej oporną była Gram-dodatnia *Listeria monocytogenes*. Szczepy wykazywały również umiarkowaną aktywność wobec *Candida albicans* czy brak zwalczania *Candida glabrata*. Ogólnie zdolność hamowania patogenów przemawia na korzyść szczepu jako kandydata na probiotyk. Co ciekawe szczep BP20.9 jako jedyny wykazujący aktywność przeciw *Candida krusei* wykazywał również β-hemolizę. Pokazuje to jak ważne są wszechstronne badania, gdzie aktywność przeciw patogenom nie wystarcza do uznania szczepu za kandydata na dobry probiotyk. Trzy z badanych szczepów zostały wyselekcjonowane jako potencjalnie probiotyczne, BP20.15 i BB10.1 zostały sklasyfikowane jako *B. subtilis*, a PY2.3 jako *Bacillus velezensis*. Szczepy te nie wykazywały hemolizy, były oporne na penicylinę, ale wrażliwe na 9 innych testowanych antybiotyków i asymilowały więcej niż 30% cholesterolu po 24h inkubacji. Obniżenie poziomu cholesterolu związane jest z niższym ryzykiem zachorowania na choroby układu krążenia, a więc jest pożądaną cechą szczepów probiotycznych. Jak już wspomniałam mgr Ahmer Bin Hafeez był odpowiedzialny za sekwencjonowanie genomów wybranych szczepów, klasyfikację taksonomiczną, czy analizy występowania genów kodujących bakteriocyny i metabolity wtórne.

Analiza bioinformatyczna została poprawnie przeprowadzona i rzetelnie opisana. W mojej opinii bardzo ciekawa jest detekcja klastrów bakteriocyn przy pomocy narzędzia BAGEL4. Aż prosi się tu o dalszą pracę eksperymentalną. Wyniki dostarczają przesłanek dotyczących potencjału probiotycznego wyselekcjonowanych szczepów, jednak nie potwierdzają ekspresji wskazanych genów, powstawania dojrzałych peptydów ani ich udziału w obserwowanej aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Należałoby sprawdzić, czy aktywność utrzymuje się po usunięciu komórek producenta przy uwzględnieniu adekwatnych kontroli negatywnych (podobnie jak w pracy

poprzedniej). Aktywne próbki należałoby zbadać po zakwaszeniu pH, działaniu katalazy i wybranych proteaz. Utrata aktywności po proteolizie wspierałaby hipotezę udziału składnika białkowego, lecz nie identyfikowałaby konkretnej bakteriocyny. **Jakie doświadczenia zatem zaproponowałby Doktorant w celu oczyszczenia i identyfikacji wybranych, aktywnych peptydów antybakteryjnych?**

Wynikiem mojej naukowej ciekawości są pytania dotyczące części eksperymentalnych. Jak udowodnić, że szczep bakterii ma rzeczywiście właściwości probiotyczne bez specyficznych testów *in vivo*? To pytanie retoryczne. Jednak coraz częściej mówi się o istotności łączenia badań teoretycznych i eksperymentalnych. Często wynikiem naszej pracy są duże zbiory danych, których analiza poprzez programy komputerowe pozwala na „wyselekcjonowanie", przykładowo szczepów bakterii o właściwościach prozdrowotnych czy małej grupy genów i ich produktów do dalszej analizy.

W tym kontekście podobała mi się praca nr 3. Trzy izolaty bakterii wymienione poprzednio (BP20.15, BB10.1 i PY2.3) zostały poddane analizie z wykorzystaniem szeregu narzędzi bioinformatycznych w celu zbadania kompletności genomów, wyszukania czynników wirulencji czy genów oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe. Cała analiza była bardzo kompleksowa, a Doktorant w mojej ocenie wykorzystał imponującą liczbę algorytmów i testów. Narzędzie Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs (BUSCO) zostało wykorzystane do analizy kompletności genomu. Wysokie wartości BUSCO oznaczają wysoką kompletność analizowanego zestawu konserwowanych genów. Analiza ta połączona z poprzednio wykonaną oceną poprzez program QUAST (wyniki umieszczone w publikacji nr 2) oraz badanie pangenomu i syntenii to dobry zestaw do badań porównawczych. D-GENIES jest odpowiednim narzędziem do wizualizacji porównań całych genomów na wykresach punktowych, a analiza pangenomu pozwala umieścić BB10.1, BP20.15 i PY2.3 w odniesieniu do innych genomów *B. subtilis* i *B. velezensis*.

Zgodnie z wytycznymi Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), do kluczowych kryteriów oceny szczepu jako skutecznego mikroorganizmu probiotycznego należą przede wszystkim: zdolność do przeżywania w kwaśnym środowisku żołądka oraz obecności żółci, zdolność adhezji do komórek nabłonka jelitowego, wykazywanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz brak genów oporności na antybiotyki. Wszystkie te aspekty zostały w pracy rzeczowo zbadane przy użyciu różnorodnych narzędzi bioinformatycznych. Nie będę wymieniała wszystkich programów wykorzystanych w przedstawionej pracy: KEGG/BlastKOALA oraz eggNOG-mapper v2, narzędzie CRISPR-CasFinder, VirulenceFinder, PlasmidFinder, OriTfinder to tylko niektóre z nich. Dodatkowo status GRAS Generally Recognized As Safe takich szczepów bakterii jak *B. subtilis* czy *B. velezensis* przemawia na korzyść ich potencjału probiotycznego.

Drobne uwagi dotyczą Tabeli 2. W tabeli dotyczącej genów odpowiedzi na stres w części czynników adhezji jest pewna niespójność, gdyż w tekście wymieniana jest sortaza A (*srt*A), a w Tabeli 2 sortaza D (*srt*D). Podobnie w tekście *hsl*O określany jest jako gen kodujący protezę, a w Tabeli jako białko opiekuńcze. Potencjalne białko YtnI wymienione jest w Tabeli 2 dwa razy jako antyoksydant, a *atp*B i *atp*D mają w Tabeli 2 ten sam identyfikator Uniprot (P37809), podczas gdy ich identyfikatory to P37813 i P37809. Te drobne błędy jak najbardziej mogą mieć miejsce przy nagromadzeniu tak dużej liczby danych.

Chciałabym w tym miejscu jednak zwrócić uwagę, że np. wykrycie białek adhezyjnych nie dowodzi kolonizacji jelita, czyli adhezji do nabłonka jelit i tu potrzebne byłyby dodatkowe testy *in vivo*. W poprzedniej pracy wykonane zostały testy pośrednie - agregacji, ko-agregacji, czy powinowactwa komórek do p-ksylenu. Podobnie określenie regionu profaga jako „intact" przez program PHASTER nie dowodzi zdolności do wytwarzania aktywnych cząstek fagowych. Dobrym przykładem konieczności weryfikacji eksperymentalnej założeń teoretycznych jest wykrycie w genomach wszystkich trzech badanych szczepów hemolizyny (*hly*III) pomimo braku obserwowanej aktywności hemolitycznej (szczepy wykazywały tzw. hemolizę $\gamma$). Podobnie program Resfinder 4.1 wykazał obecność oporności na streptomycynę, której nie potwierdzono w badaniach laboratoryjnych. W przedstawionych do oceny pracach mgr Ahmer Bin Hafeez wielokrotnie podkreśla potrzebę przeprowadzenia dodatkowych testów laboratoryjnych. Takie podejście zasługuje na uznanie, ponieważ świadczy o tym, że Doktorant jest świadomy ograniczeń predykcji teoretycznych.

Kolejna przedłożona do oceny publikacja również dotyczy charakterystyki *in silico* białek pochodzących z bakterii *Bacillus paralicheniformis* i *Bacillus subtilis* izolowanych z próbek miodu. Szczepy te (SZA14 i SZA16 oraz SZB3) były wcześniej opisywane w pracy nr 1. Analiza zsekwencjonowanych genomów wymienionych powyżej bakterii wykazała obecność około 10% otwartych ramek odczytu kodujących białka o nieznanej funkcji. **Mgr Ahmer Bin Hafeez włożył niezmiernie dużo pracy w określenie ich struktur przestrzennych czy funkcji biologicznej.** Szereg narzędzi bioinformatycznych posłużyło do wytypowania 56 białek do dalszej analizy oraz kolejno do ich charakterystyki. Odnoszę wrażenie, że mgr Ahmer zna wszystkie narzędzia bioinformatyczne używane w biologii molekularnej mikroorganizmów. Chcemy sprawdzić lokalizację wewnątrzkomórkową białka – odpowiedź brzmi „bardzo proszę", chcemy wiedzieć czy białko zawiera peptyd sygnałowy – „oczywiście**". Badania mgr Ahmera stanowią niezwykle cenny materiał do dalszych analiz.** W bazach danych takich jak NCBI GenBank wiele produktów białkowych ma przypisaną nieprawidłową funkcję, a raz przypisana aktywność jest często przytaczana w kolejnych publikacjach naukowych, przez co błąd jest utrwalany. **Rzetelna wstępna analiza, podobna do testów przedstawionych przez mgr Ahmera pozwala na zminimalizowanie błędu, co zasługuje na pozytywną uwagę.**

Mgr Ahmer Bin Hafeez z powodzeniem przewidział funkcje 56 białek hipotetycznych i wskazał na ich udział w kluczowych procesach komórkowych, takich jak sporulacja, tworzenie biofilmu, regulacja metaboliczna, ruchliwość czy replikacja DNA.

Naturalną kontynuacją powyższych badań byłaby kolejna publikacja walidująca przewidywaną funkcję kilku wybranych spośród 56 scharakteryzowanych *in silico* białek. Możliwe, że praca taka ukaże się w przyszłości. **Które z powyższych 56 białek Doktorant wybrałby w pierwszej kolejności do dalszej analizy funkcjonalnej i dlaczego?**

W dwuautorskiej pracy nr 5 (autorami publikacji są mgr Ahmer Bin Hafeez oraz prof. Piotr Szweda) zwalidowany został potencjał przeciwdrobnoustrojowy dwóch szczepów *Bacillus subtilis* (Miodo8 i Miodo10) wyizolowanych z wielokwiatowego miodu imbirowego. Moją uwagę przykuł niepoprawny zapis numerów ATCC oraz DSM wykorzystanych w pracy bakterii. Powinno być *S. aureus* ATCC 25923, nie ATCC 25,923. Numery ATCC są unikalnymi identyfikatorami szczepów, a nie wartościami liczbowymi, dlatego nie stosuje się w nich separatorów tysięcy (przecinków, kropek ani spacji). Ta drobna uwaga nie umniejsza jednak wysokiej wartości naukowej publikacji.

Lektura publikacji nr 5 wraz z czterema przedłożonymi do opinii pracami pozwala dostrzec stopniowy rozwój Doktoranta, coraz sprawniejsze korzystanie z literatury przedmiotu oraz prowadzenie rzeczowej i dojrzałej merytorycznie dyskusji. W publikacji nr 5 Doktorant trafnie konkluduje, że obecność danego genu nie świadczy, przykładowo, o funkcjonalnej aktywności przeciwbakteryjnej badanego szczepu. Obecność w genomach bakterii klastrów genów odpowiedzialnych za wytwarzanie określonych związków, np. surfaktyny nie oznacza, że bakteria dany związek produkuje. Operon *srf* jest regulowany poprzez zjawisko *quorum sensing* i system ComP-ComA. Mutacje zaburzające działanie tego układu mogą sprawić, że geny pozostaną nieaktywne mimo obecności w genomie. Podobnie standardowe badanie w warunkach tlenowych może nie ujawnić potencjału bakterii do produkcji subtilozyny A. Dyskusję przedstawioną w pracy oceniam bardzo pozytywnie i z dużym zainteresowaniem oczekuję kolejnych publikacji Doktoranta.

W ostatniej części dysertacji Doktorant opisuje odkrycie Paralichenidyny (Pld), lantibiotyku zbudowanego z peptydu $\alpha$ (Pld $\alpha$) i peptydu $\beta$ (Pld $\beta$) syntetyzowanego przez szczepy *B. paralicheniformis* SZA14 i SZA16. Doktorant wykonał analizy sekwencji obu peptydów, struktury Paralichenidyny oraz analizy filogenetyczne prepropeptydów i peptydów rdzeniowych. Kolejno wyniki symulacji dynamiki molekularnej pokazały, że Pld $\alpha$ ma wysokie powinowactwo do lipidu II, w przeciwieństwie do marginalnego wiązania peptydu $\beta$. I tu ostatnie już pytanie do Doktoranta: **Jak eksperymentalnie można wykazać wiązanie Paralichenidyny do lipidu II?**

**Podsumowanie i Wniosek końcowy**

Wyniki rozprawy potwierdzają, że produkty pszczele, takie jak miód, pyłek pszczeli i pierzga

zawierają gatunki *Bacillus* o potencjale przeciwdrobnoustrojowym i probiotycznym. Analizy potwierdzają również potrzebę dalszej, eksperymentalnej weryfikacji danych uzyskanych *in silico*. Przedstawione do oceny prace są spójne tematycznie, a badania nad chociażby nowo zidentyfikowanym lantybiotykiem Paralichenidyną wydają się bardzo obiecujące i wnoszą oryginalny wkład w rozwój wiedzy naukowej. Doktorant konsekwentnie rozwija swoje zainteresowania, wykazując systematyczność, zaangażowanie oraz rosnącą samodzielność badawczą.

Warto podkreślić, że mgr Ahmer Bin Hafeez odbył trzy zagraniczne staże naukowe: w Katedrze Chemii na Wydziale Nauk Przyrodniczych, Matematycznych i Inżynieryjnych King's College London w Wielkiej Brytanii; w Katedrze Biotechnologii i Biomedycyny Duńskiego Uniwersytetu Technicznego; oraz w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Tesalskiego w Grecji.

Jego aktywność naukowa znalazła również odzwierciedlenie w uzyskanych stypendiach i grantach. W latach 2023–2024 otrzymał minigranty przeznaczone dla doktorantów i młodych pracowników naukowych, a także dofinansowanie udziału w konferencji Trends in Natural Products Research Meeting w Paryżu. Uzyskał także międzynarodowe stypendia doktoranckie Francium (2022–2026) i Polonium (2021–2022). W 2024 r. wyróżniono Doktoranta stypendium Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej (NAWA) dla najlepszych doktorantów realizujących projekty we współpracy międzynarodowej, a w 2025 r. uzyskał grant na wymianę naukową Europejskiej Organizacji Biologii Molekularnej (EMBO) (choć tu zabrakło bardziej szczegółowych informacji jakiej wymiany naukowej to stypendium dotyczyło).

Podsumowując, Mgr Ahmer Bin Hafeez konsekwentnie rozwija działalność naukową w obszarze mikrobiologii i bioinformatyki, koncentrując się na genomowej charakterystyce bakterii, identyfikacji związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz ocenie potencjału biotechnologicznego mikroorganizmów izolowanych z produktów pszczelich. Rozprawa doktorska Pana mgr Ahmera Bin Hafeez spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

Z całym przekonaniem wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Gdańskiej o dopuszczenie Pana mgr Ahmera Bin Hafeeza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,

Magdalena Płotka

Signed by / Podpisano przez:
Magdalena Agata Płotka
Uniwersytet Gdański
Date / Data: 2026-11-02 14:41