

**ZACHODNIOPOMORSKI UNIWERSYTET
TECHNOLOGICZNY W SZCZECINIE**
WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII I HODOWLI ZWIERZĄT
KATEDRA MIKROBIOLOGII I BIOTECHNOLOGII

Xymena Stachurska

Rozprawa doktorska

**WPLYW WYBRANYCH CZYNNIKÓW
PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH NA
AKTYWNOŚĆ BAKTERIOLITYCZNA
BAKTERIOFAGÓW**

*Rozprawa doktorska wykonana w
Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii
pod kierunkiem
dr hab. inż. Pawła Nawrotka, prof. ZUT*

Szczecin 2023

**Publikacje naukowe wchodzące w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską
zatytułowaną:**

**„Wpływ wybranych czynników przeciwdrobnoustrojowych na
aktywność bakteriolityczną bakteriofagów”**

[D-1] Stachurska, X., Roszak, M., Jabłońska, J., Mizielńska, M., Nawrotek, P. (2021) Double-layer agar (DLA) modifications for the first step of the phage-antibiotic synergy (PAS) identification. *Antibiotics*, 10, 1306. DOI: 10.3390/antibiotics10111306.

IF₂₀₂₁ – 5,222; 70 pkt. MEiN

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań oraz udziale we wszystkich etapach eksperymentu, które obejmowały: wybranie i przygotowanie mikroorganizmów oraz roztworów antybiotyków, przygotowanie pożywek i reagentów testowych, zorganizowanie stanowiska badawczego, przeprowadzenie eksperymentów polegających na wyborze antybiotyków wykazujących silny efekt synergii na płytkach Petriego, określenie wrażliwości gospodarza bakteryjnego na wybrane antybiotyki i przygotowanie wariantów metody podwójnej warstwy agaru wraz z późniejszym wyborem najefektywniejszej modyfikacji tej metody. Opracowałam i zwizualizowałam uzyskane wyniki, przeprowadziłam analizy statystyczne oraz napisałam samodzielnie większą część manuskryptu. W pracy byłam również autorem korespondencyjnym. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

[D-2] Stachurska, X., Cendrowski, K., Pachnowska, K., Piegat, A., Mijowska, E., Nawrotek, P. (2022) Nanoparticles influence lytic phage T4-like performance *in vitro*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 7179, DOI: 10.3390/ijms23137179.

IF₂₀₂₂ – 6,208; 140 pkt. MEiN

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań oraz udziale w znacznej większości etapów eksperymentu, które obejmowały: wybranie i przygotowanie mikroorganizmów i zawiesin roboczych nanocząstek, przygotowanie pożywek i mikrobiologicznych reagentów testowych, zorganizowanie mikrobiologicznego stanowiska badawczego, przeprowadzenie eksperymentów oceny zdolności łyśnięcia bakteriofaga koinkubowanego z nanocząstkami, oceny aktywności litycznej bakteriofaga eksponowanego na działanie nanocząstek w kulturach płynnych, wyznaczania okresu eklipsy w rozwoju bakteriofaga eksponowanego na działanie nanocząstek oraz brałam udział w procesie wizualizacji mikroskopowej interakcji bakteriofag-nanocząstki. Opracowałam i zwizualizowałam uzyskane wyniki, przeprowadziłam analizy statystyczne oraz napisałam samodzielnie większą część manuskryptu. W pracy byłam również autorem korespondencyjnym. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

[D-3] Stachurska, X., Mizielińska, M., Ordon, M., Nawrotek, P. (2023) Combinations of echinacea (*Echinacea purpurea*) and rue (*Ruta graveolens*) plant extracts with lytic phages: a study on interactions. *Applied Sciences*, 13, 4575, DOI: 10.3390/app13074575.

IF₂₀₂₃ – 2,838; 100 pkt. MEiN

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań oraz udziale we wszystkich etapach eksperymentu, które obejmowały: wybranie i przygotowanie mikroorganizmów oraz rozcieńczeń roboczych ekstraktów roślinnych, przygotowanie pożywek i reagentów testowych, zorganizowanie stanowiska badawczego, przeprowadzenie eksperymentów oceny wpływu ekstraktów na komórki gospodarzy bakteryjnych, oceny wpływu ekstraktów na aktywność i zdolność lysinkowania bakteriofagów, analizy stechiometrii interakcji ekstraktów i bakteriofagów w środowisku gospodarzy bakteryjnych, analizy infekcji fagowych i profilów lizy bakteriofagów z dodatkiem ekstraktów roślinnych w środowisku gospodarzy bakteryjnych oraz brałam udział w wizualizacji wpływu ekstraktów roślinnych i bakteriofagów na komórki gospodarzy bakteryjnych. Opracowałam i zwizualizowałam uzyskane wyniki, przeprowadziłam analizy statystyczne oraz napisałam samodzielnie większą część manuskryptu. W pracy byłam również autorem korespondencyjnym. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

Wszystkie prace wchodzące w skład cyklu stanowiącego niniejszą rozprawę doktorską zostały opublikowane w otwartym dostępie (Open Access). Dodatkowo, jedna nie opublikowana jeszcze praca znajdująca się obecnie w recenzji (B-1), nawiązująca bezpośrednio do tematu niniejszej rozprawy, została udostępniona jako preprint w bazie bioRxiv pod adresem: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.06.27.546765v1>

[B-1] Stachurska, X., Mizielińska, M., Ordon, M., Nawrotek, P. The use of plant extracts and bacteriophages as an alternative therapy approach in combating bacterial infections: the study of lytic phages and *Stevia rebaudiana*.

DOI: 10.1101/2023.06.27.546765

Ogólna liczba punktów za cykl prac stanowiących rozprawę doktorską według wykazu czasopism naukowych MEiN z dnia 1 grudnia 2021 r., zgodny z rokiem ukazania się prac wynosi 310 punktów.

Sumaryczny Impact Factor (IF) za cykl prac stanowiących rozprawę doktorską zgodny z rokiem ukazania się prac wynosi 14,268.

W przypadku wyżej wymienionych prac eksperymentalnych mam wiodący udział w badaniach, od udziału w opracowaniu koncepcji i metodologii, po opracowanie, interpretację i opublikowanie wyników. We wszystkich opublikowanych pracach byłam również autorem korespondencyjnym. Prowadzone przeze mnie badania miały charakter interdyscyplinarny, dlatego były wykonywane we współpracy z ekspertami z różnych obszarów nauk inżynierskich i przyrodniczych, mających doświadczenie w badaniach związanych z mikrobiologią, chemią, biotechnologią oraz nanotechnologią.

Podczas prowadzenia badań, których wyniki umożliwiły mi przygotowanie publikacji składających się na niniejszą rozprawę doktorską, współpracowałam z naukowcami będącymi pracownikami Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie (ZUT): dr hab. inż. Małgorzatą Mizieleńską, prof. ZUT i mgr inż. Magdaleną Ordon z Centrum Bioimmobilizacji i Innowacyjnych Materiałów Opakowaniowych na Wydziale Nauk o Żywności i Rybactwa, prof. dr hab. Ewą Mijowską z Katedry Fizykochemii Nanomateriałów na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej, dr inż. Agnieszką Piegat z Katedry Inżynierii Polimerów i Biomateriałów na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej, mgr inż. Joanną Jabłońską z Katedry Inżynierii Chemicznej i Procesowej na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej, dr inż. Krzysztofem Cendrowskim z Katedry Budownictwa Ogólnego na Wydziale Budownictwa i Inżynierii Środowiska oraz dr inż. Kamilą Pachnowską z Katedry Ogrodnictwa na Wydziale Kształtowania Środowiska i Rolnictwa. Nawiązałam również współpracę z mgr inż. Martą Gliźniewicz z Zakładu Medycyny Laboratoryjnej na Wydziale Farmacji, Biotechnologii Medycznej i Medycyny Laboratoryjnej, Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie.

Współpraca obejmowała pomoc w wykonywaniu badań i analiz, wykorzystanie specjalistycznego sprzętu oraz pomoc w interpretacji otrzymanych wyników, a także udział w przygotowywaniu publikacji naukowych.

Załącznik 1. Kopie publikacji naukowych wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską.

Załącznik 2. Kopie suplementów publikacji naukowych wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską.

Załącznik 3. Oświadczenia współautorów publikacji naukowych wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską wraz z określeniem ich indywidualnego udziału.

Załącznik 4. Sumaryczne zestawienie dorobku naukowego.

Autoreferat

Xymena Stachurska

Rozprawa doktorska

**WPLYW WYBRANYCH CZYNNIKÓW
PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH NA
AKTYWNOŚĆ BAKTERIOLITYCZNA
BAKTERIOFAGÓW**

Szczecin 2023

„Pierwszego odkrycia badacz może dokonać sam, lecz im bardziej świat staje się skomplikowany, tym trudniej doprowadzić mu badania do końca bez uciekania się do współpracy z innymi.”

– Aleksander Fleming

Pragnę złożyć szczególne podziękowania:
Panu dr hab. inż. Pawłowi Nawrotkowi, prof. ZUT
za opiekę i pomoc promotorską pozwalającą mi jednocześnie
zachować wolność i samodzielność badawczą,
otwartość na cenne dyskusje, wyrozumiałość i wielką życzliwość.

Rodzicom za bezgraniczne wsparcie, troskę i nieustanną wiarę.

Przyjaciołom za ogromną motywację i otuchę w trudnych chwilach.

Doktorom i doktorantom z pokoju 2/27
za wszystkie niezapomniane lata wzajemnej pomocy i wsparcia
oraz doskonałą atmosferę pracy.

Pracownikom Katedry Mikrobiologii i Biotechnologii
za serdeczność i pomoc w trudnych sytuacjach
oraz
wszystkim osobom, które przyczyniły się do powstania niniejszej dysertacji
...w tym samej sobie – za wytrwałość i upór.

Spis treści

Streszczenie.....	8
Abstract.....	10
1. Wprowadzenie.....	12
2. Hipotezy	14
3. Cel badawczy	14
4. Materiał i metody badawcze	15
4.1. Mikroorganizmy	15
4.2. Czynniki przeciwdrobnoustrojowe	15
4.3. Namnażanie bakteriofagów oraz przygotowanie lizatów	17
4.4. Określanie najefektywniejszej modyfikacji metody podwójnej warstwy agaru w celu uwidocznienia efektu synergii fagów i antybiotyków (PAS)	17
4.4.1. Wybór antybiotyków wykazujących silny efekt synergii na płytkach Petriego.....	17
4.4.2. Określanie wrażliwości gospodarza bakteryjnego na wybrane antybiotyki	18
4.4.3. Wybór modyfikacji metody podwójnej warstwy agaru	18
4.5. Określenie wpływu wybranych nanocząstek na wiriony faga litycznego typu T4 oraz obserwacja interakcji.....	19
4.5.1. Charakterystyka nanocząstek: analiza mikroskopowa, potencjały zeta i przygotowanie zawiesin roboczych.....	19
4.5.2. Ocena zdolności tysinkowania litycznego faga typu T4 koinkubowanego z wybranymi nanocząstkami	19
4.5.3. Ocena aktywności litycznej faga typu T4 ekspozowanego na działanie wybranych nanocząstek w kulturach płynnych	19
4.5.4. Wyznaczanie okresu eklipsy litycznego faga typu T4 ekspozowanego na działanie wybranych nanocząstek.....	20
4.5.5. Wizualizacja mikroskopowa interakcji litycznego faga typu T4 oraz wybranych nanocząstek	20
4.6. Określanie wpływu ekstraktów roślinnych na referencyjne bakteriofagi lityczne	20
4.6.1. Przygotowanie ekstraktów roślinnych.....	20
4.6.2. Ocena wpływu ekstraktów roślinnych na komórki gospodarzy bakteryjnych	21
4.6.3. Ocena wpływu ekstraktów roślinnych na aktywność i zdolność tysinkowania referencyjnych fagów litycznych	21
4.6.4. Stechiometrie interakcji ekstraktów roślinnych i referencyjnych fagów litycznych w środowisku gospodarzy bakteryjnych.....	22
4.6.5. Infekcja fagowa i profile lizy referencyjnych fagów litycznych z dodatkiem ekstraktów roślinnych w środowisku gospodarzy bakteryjnych	22
4.6.6. Wizualizacja wpływu ekstraktów roślinnych i referencyjnych fagów litycznych na komórki gospodarzy bakteryjnych.....	22
4.7. Analiza statystyczna	23
5. Uzyskane wyniki badań	23
6. Wnioski	29
7. Piśmiennictwo.....	30
8. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	32
8.1. Osiągnięcia naukowe związane z badaniami z wykorzystaniem bakteriofagów litycznych	33
8.2. Osiągnięcia naukowe związane z badaniami z wykorzystaniem czynników przeciwdrobnoustrojowych.....	34
8.3. Osiągnięcia naukowe związane działalnością badawczą Katedry Mikrobiologii i Biotechnologii	36

Streszczenie

Głównym celem rozprawy doktorskiej było określenie wpływu wybranych czynników przeciwdrobnoustrojowych na aktywność bakteriolityczną bakteriofagów, mając przede wszystkim na uwadze interakcje pomiędzy tymi czynnikami. Przewidywano obecność interakcji o różnym charakterze – synergistycznym i antagonistycznym, a także brak obecności znaczących oddziaływań.

W ramach tematu rozprawy, podjęto trzy wątki badawcze odpowiadające trzem wybranym rodzajom czynników przeciwdrobnoustrojowych. Czynniki te obejmowały antybiotyki, nanomateriały oraz ekstrakty roślinne w połączeniu z bakteriofagami litycznymi. Obrane wielokierunkowe podejście badawcze miało na celu określenie, czy dane czynniki przeciwdrobnoustrojowe mają potencjał koaplikacyjny z fagami litycznymi – czyli czy istnieje możliwość ich jednoczesnej aplikacji w ramach łączonej terapii antybakteryjnej.

Wraz z odkryciem fenomenu synergii działania niektórych antybiotyków i fagów litycznych (ang. phage-antibiotic synergy, PAS), środowisko naukowe zainteresowało się badaniami interakcji wyżej wymienionych czynników, co zaowocowało pojawieniem się znacznej ilości publikacji naukowych o tej tematyce w relatywnie krótkim czasie. Podczas studiowania literatury pod kątem planowania badań dysertacji doktorskiej, zauważono jednak brak ujednoczenia metody wstępnego wykrywania PAS – w wielu pracach posługiwano się techniką podwójnej warstwy agarowej na płytkach Petriego (double-layer agar, DLA), jednakże sposób aplikacji antybiotyków różnił się umiejscowieniem: od dodawania czynnika w postaci krążków na warstwę górną agaru, po mieszanie go z agarem dolnym. Ta obserwacja pozwoliła na zaplanowanie pierwszych badań dysertacji, których celem było określenie najefektywniejszej modyfikacji metody podwójnej warstwy, pozwalającej na wykrycie połączeń fag-antybiotyk o potencjale synergistycznym [D-1]. Do badań użyto litycznego bakteriofaga typu T4 oraz 43 antybiotyki należące do różnych grup. Przetestowano siedem różnych modyfikacji metody DLA, pod względem miejsca aplikacji antybiotyku oraz obecności lub braku agaru dolnego. W badaniach wykazano, że całkowita liczba łysek fagowych na płytkach zależała głównie od zastosowanego antybiotyku. Różnice w ilości łysek zależały od rodzaju modyfikacji metody DLA. Udowodniono, że w celu najlepszej wizualizacji efektu PAS, najlepsze wyniki dostarczyła modyfikacja z użyciem krążków antybiotykowych, w której nastąpiło ogólne zwiększenie zróżnicowania średnic łysek fagowych w wyniku aplikacji antybiotyku bezpośrednio na górną warstwę agaru w obecności agaru dolnego, co mogło wynikać przede wszystkim z powolnej dyfuzji antybiotyku do strefy wzrostu bakterii. Natomiast największą łączną liczbę łysek uzyskano przez dodanie antybiotyku do agaru dolnego z obecnością agaru górnego. Wskazuje to, że chociaż antybiotyk mógłby wykazywać efekt PAS standardową metodą krążkową, warto byłoby zbadać, czy efekt jest równie zadowalający przy aplikacji antybiotyków bezpośrednio do agaru dolnego, w odniesieniu do użycia tego samego bakteriofaga i gospodarza bakteryjnego [D-1].

Badania naukowe podejmujące temat nanomateriałów i bakteriofagów w głównej mierze analizowały możliwość i znaczenie tworzenia nanomateriałów z części składowych lub nawet całych struktur fagowych. Z uwagi na brak literatury opisującej interakcje bakteriofagów i nanomateriałów (traktując nanomateriały jako drugi, autonomiczny czynnik przeciwdrobnoustrojowy), zdecydowano się na przeprowadzenie pionierskich badań mających na celu eksperymentalne określenie ich możliwości koaplikacyjnych jako część niniejszej dysertacji [D-2]. W pracy użyto litycznego bakteriofaga typu T4 oraz sześć różnych nanomateriałów w postaci nanocząstek (ang. nanoparticles, NP): SiO₂, TiO₂-SiO₂, TiO₂, Fe₃O₄, Fe₃O₄-SiO₂ i SiO₂-Fe₃O₄-TiO₂. W publikacji szczegółowo zbadano: zdolność faga do tworzenia

łysinek, wydajność lityczną faga, czas powstania plonów fagowych oraz ich miana na podstawie oznaczeń fazy eklipsy. Wykazano, że obrazowanie za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) oraz wyniki potencjałów zeta nanocząstek (ZP) były kluczowe dla wyjaśnienia uzyskanych danych mikrobiologicznych. Podczas interpretacji wyników zaproponowano hipotezę zakładającą, że sama obecność ładunku nanocząstek nie jest wystarczająca, aby bakteriofag adherował w sposób uporządkowany i specyficzny do nanocząstek, w konsekwencji wpływając na wydajność faga. Największy wpływ na obserwowane interakcje miały wartości potencjałów zeta nanocząstek. Wartości graniczne ZP ustalono przy: $ZP < -35$ (mV) dla efektu wiązania ogonka fagowego i $ZP > 35$ (mV) dla wiązania główki fagowej. Kiedy nanocząstki nie spełniały tych wymagań, fizyczne oddziaływania fag-nanocząstka stają się niespecyficzne. Wykazano również, że nanocząstki wpływały na aktywność lityczną faga, niezależnie od ich zastosowanego stężenia. Większość badanych nanocząstek pozytywnie wpłynęła na wydajność lityczną faga, z wyjątkiem SiO_2 i $Fe_3O_4-SiO_2$, o potencjale ZP niższym niż 35 (mV), wiążąc się z ogonkiem fagowym [D-2].

Antybakteryjne działanie ekstraktów roślinnych jest tematem cieszącym się niesłabnącym zainteresowaniem ze strony środowiska naukowego, często opisywanym w literaturze fachowej. Jednakże publikacje opisujące wpływ ekstraktów na bakteriofagi lityczne jest wątkiem podejmowanym stosunkowo rzadko, a dostępne prace są w dużej mierze nieaktualne, więc wykorzystują również metody bardzo podstawowe i niedokładne. Jeszcze rzadziej można napotkać badania przedstawiające wyniki połączenia ekstraktów roślinnych i fagów w środowisku bakteryjnym, dlatego też postanowiono przeprowadzić analizy interakcji tych wieloczynnikowych mieszanin, wykorzystując wiele nowoczesnych metod badawczych [D-3, nieopublikowana praca B-1]. W badaniach wykorzystano referencyjne bakteriofagi lityczne (MS2, T4 i phi6) i metanolowe ekstrakty roślinne, pozyskane z ziela jeżówki purpurowej (*Echinacea purpurea*) i ruty (*Ruta graveolens*). Ze względu na złożoność oddziaływań, przeprowadzono następujące eksperymenty: ocenę wpływu ekstraktów roślinnych na komórki gospodarzy bakteryjnych metodą mikrorozcieńczeń, ocenę wpływu ekstraktów roślinnych na aktywność i zdolność łysinkowania fagów metodą koinkubacji, synografie oddziaływań statycznych ekstraktów roślinnych i fagów w środowisku gospodarzy bakteryjnych, profile lizy fagowej podczas oddziaływań dynamicznych badanych mieszanin w bioreaktorach oraz wizualizację wpływu ekstraktów roślinnych i fagów na komórki gospodarzy bakteryjnych za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). W badaniach wykazano obecność interakcji antagonistycznych: ekstrakty z jeżówki purpurowej i ruty wykazywały działanie antyfagowe i bakteriobójcze. Udowodniono, że wpływ niskich stężeń ekstraktu na mikroorganizmy zależał od gatunków testowanych fagów i gospodarzy bakteryjnych, podczas gdy wysokie stężenia generalnie hamowały lizę bakteryjną. Co więcej, interakcje obserwowane w środowisku statycznym różniły się od tych przeprowadzonych w środowisku dynamicznym, co wskazało na kluczowe znaczenie wykonywania wielu analiz podczas badania tak złożonych mieszanin [D-3].

Abstract

The main objective of the doctoral dissertation was to determine the effect of selected antimicrobial agents on the bacteriolytic activity of bacteriophages, taking into account the interactions between these agents. The presence of interactions of various nature - synergistic and antagonistic, as well as the absence of significant interactions - was predicted.

As part of the dissertation topic, three research trends were undertaken, corresponding to three selected types of antimicrobial agents. These trends included antibiotics, nanomaterials and plant extracts combined with lytic bacteriophages. The chosen multidirectional research approach was aimed at determining whether the given antimicrobial agents have co-application potential with lytic phages, i.e. whether there is a possibility of their simultaneous application as part of combined antibacterial therapy.

With the discovery of the phenomenon of synergistic action of some antibiotics and lytic phages (phage-antibiotic synergy, PAS), the scientific community became interested in research on the interactions of the above-mentioned factors, which resulted in the appearance of a large number of scientific papers on this subject in a relatively short time. While studying the literature in terms of planning research for presented doctoral dissertation, the lack of unification of the method for the initial detection of PAS was noticed - in many papers the technique of double-layer agar on Petri dishes (DLA) was used, but the method of application of antibiotics differed in its' location: from adding antibiotics in the form of disks on the top agar layer, to mixing them with the bottom agar. This observation made it possible to plan the first dissertation studies, the aim of which was to determine the most effective modification of the double-layer agar method, allowing the detection of phage-antibiotic combinations with synergistic potential [D-1]. The lytic T4-like bacteriophage and 43 different antibiotics belonging to various classes were used in the study. Seven different modifications of the DLA method were tested in terms of the antibiotic application placement and the presence or absence of bottom agar. The studies showed that the total number of phage plaques on the plates depended mainly on the antibiotic used. Differences in the number of plaques depended on the type of modification of the DLA method. It was proved that in order to best visualize the PAS effect, the best results were obtained by the modification with the use of antibiotic disks, in which there was a general increase in the diversity of phage plaque diameters as a result of the application of the antibiotic directly to the top agar layer in the presence of the bottom agar, which could be primarily due to slow diffusion of the antibiotic to the bacterial growth zone. However, the highest total number of plaques was obtained by adding the antibiotic to the bottom agar with the presence of the top agar. This indicates that although the antibiotic could show the PAS effect by the standard disk method, it would be worth investigating whether the effect is equally satisfactory when applying antibiotics directly to the bottom agar, in relation to the use of the same bacteriophage and bacterial host [D-1].

Scientific research dealing with the topic of nanomaterials and bacteriophages mainly analyzed the possibility and applicability of creating nanomaterials from components or even entire phage structures. Due to the lack of literature describing the interaction of bacteriophages and nanomaterials (treating nanomaterials as a second, autonomous antimicrobial agent), it was decided to conduct innovative research aimed at experimentally determining their co-application capabilities as part of this dissertation [D-2]. The lytic bacteriophage T4-like and six different nanomaterials in the form of nanoparticles (NP) were used in this work: SiO₂, TiO₂-SiO₂, TiO₂, Fe₃O₄, Fe₃O₄-SiO₂ and SiO₂-Fe₃O₄-TiO₂. In the paper it was examined in detail: the plaque-forming ability of the phage, phage lytic efficiency, the time of phage progeny formation and their titers based on the determination of their eclipse phases. Transmission electron

microscopy (TEM) imaging and nanoparticle zeta potential (ZP) results were shown to be crucial to explaining the obtained microbiological data. During the interpretation of the results, a hypothesis was proposed that the mere presence of the nanoparticle charge is not sufficient for the bacteriophage to adhere in an orderly and specific way to the nanoparticles, consequently affecting the performance of the phage. The zeta potentials of the nanoparticles had the greatest impact on the observed interactions. ZP thresholds were set at: $ZP < -35$ (mV) for phage tail binding effect and $ZP > 35$ (mV) for phage head binding effect. When the nanoparticles did not meet these requirements, the physical interactions of the phage-nanoparticle mixes became non-specific. It was also shown that the nanoparticles affected the lytic activity of the phage, regardless of their concentration used. Most of the studied nanoparticles had a positive effect on the lytic efficiency of the phage, with the exception of SiO_2 and $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$, with the ZP potential lower than 35 (mV), binding to the phage tail [D-2].

The antibacterial effect of plant extracts is a subject of unflagging interest from the scientific community, often described in the professional literature. However, papers describing the effect of extracts on lytic bacteriophages is a relatively rare topic, and available publications are largely outdated, so they also use very basic and inaccurate methods. Studies presenting the results of combining plant extracts and phages in a bacterial environment are even rarer, which is why it was decided to conduct interaction analyzes of these multifactor mixtures using many modern research methods [D-3, unpublished paper B-1]. Reference lytic bacteriophages (MS2, T4 and phi6) and methanolic plant extracts obtained from echinacea (*Echinacea purpurea*) and rue (*Ruta graveolens*) were used in this study. Due to the complexity of interactions, the following experiments were carried out: evaluation of the effect of plant extracts on bacterial host cells using the microdilution method, evaluation of the effect of plant extracts on the activity and plaque-forming ability of phages by co-incubation method, synographies of static interactions of plant extracts and phages in the bacterial host environment, phage lysis profiles during dynamic growth experiments of the tested mixtures in bioreactors and visualization of the effect of plant extracts and phages on bacterial host cells using a scanning electron microscope (SEM). The studies showed the presence of antagonistic interactions: extracts of echinacea and rue showed antiphage and bactericidal activity. It was proved that the effect of low extract concentrations on microorganisms depended on the tested phage and bacterial hosts species, while high concentrations generally inhibited bacterial lysis. Moreover, the interactions observed in the static environment differed from those performed in the dynamic environment, which indicated the crucial importance of performing multiple analyzes when studying such complex mixtures [D-3].

1. Wprowadzenie

Problem naukowy, podjęty w ramach rozprawy doktorskiej analizuje zagadnienie wpływu wybranych czynników przeciwdrobnoustrojowych na aktywność bakteriolityczną bakteriofagów, przede wszystkim skupiając się na interakcjach pomiędzy tymi czynnikami. Tego typu badania mogą pozwolić na określenie potencjalnych możliwości ich jednoczesnej aplikacji w terapiach łączonych, w ramach alternatywnego podejścia do zwalczania infekcji bakteryjnych.

Bakteriofagi (fagi) lityczne, są wirusami specyficznymi infekującymi bakterie (gospodarzy bakteryjnych), w konsekwencji ich cyklu rozwojowego prowadząc do lizy wrażliwych gospodarzy (Sulakvelidze i in., 2001). Zainteresowanie fagami w ostatnich latach gwałtownie wzrosło w obliczu nieskuteczności rutynowo stosowanych metod terapeutycznych, choć ich stosowanie nie zostało jeszcze powszechnie przyjęte przez współczesną medycynę, z wyjątkiem Gruzji, Rosji i Polski, gdzie fagi lecznicze stosowane są od dawna (Abedon i in., 2017). Fagi wykazują znaczny potencjał antybakteryjny i jako samo namnażające się jednostki bakteriolityczne znajdują zastosowanie w monofagowej lub wielofagowej (koktajle fagowe) terapii chorób bakteryjnych (Chan i in., 2013). Fagi reprezentują najliczniejszą (ok. 10^{31}) i prawdopodobnie najstarszą, najbardziej zróżnicowaną genetycznie i najszybciej replikującą się (ok. 10^{23} infekcji na sekundę w skali Ziemi) formę biologiczną (Hatfull, 2008; Hendrix i in., 2003). Ponadto, bakteriofagi mają także inne istotne zalety, takie jak ich łatwa manipulacja i hodowla z użyciem standardowych pożywek laboratoryjnych. Dlatego proponuje się również wykorzystanie fagów jako substytutów wirusów komórek eukariotycznych (Ribeiro i in., 2020; Fedorenko i in., 2020).

Myśl, która zapoczątkowała badania wchodzące w skład niniejszej dysertacji doktorskiej, wynikała z logiki ewolucyjnego zrozumienia, że dwie efektywne, a wystarczająco różne presje selekcyjne będą prawdopodobnie bardziej skuteczne w działaniu, niż każda z nich stosowana osobno (Torres-Barceló i Hochberg, 2016). Co więcej, istnieją dowody naukowe na kolejny, niezwykle istotny aspekt przemawiający za stosowaniem terapii łączonych – neutralizacja bakterii opornych, co opisano poniżej.

Pojawienie się oporności patogenów bakteryjnych, często wynikającej z mutacji *de novo*, jest niezwykle alarmująca zarówno w aspekcie zdrowia publicznego jak i zdrowia zwierząt. Ponadto, liczba opracowywanych antybiotyków jest niewystarczająca, aby nadążyć za powstającymi potrzebami. Fagi są bardzo obiecującą alternatywą w zwalczaniu bakterii opornych, jednak ich skuteczność może być również ograniczona przez ewolucję oporności patogenów. Jednakże, w przypadku jednoczesnej aplikacji fagów i innych czynników antybakteryjnych, jeżeli już pojawiają się bakterie odporne zarówno na czynnik, jak i na fagi, to bakterie te rosną powoli ze względu na koszty wydolności komórek, co w konsekwencji sprawia, że są mniej chorobotwórcze niż bakterie wrażliwe. Poza tym, patogeny podwójnie odporne nie pojawiają się, z powodu genetycznej wymiany pomiędzy mechanizmami oporności. Ogólnie rzecz biorąc, bakterie odporne tylko na jeden czynnik są eliminowane przez inne czynniki (Zhang i Buckling, 2012).

W ramach tematu rozprawy, podjęto trzy zagadnienia badawcze odpowiadające trzem wybranym rodzajom czynników przeciwdrobnoustrojowych: antybiotekom, nanomateriałom oraz ekstraktom roślinnym w połączeniu z bakteriofagami litycznymi. Obrane wielokierunkowe podejście badawcze miało na celu określenie, czy istnieje możliwość ich jednoczesnej aplikacji w ramach łączonej terapii antybakteryjnej (potencjał koaplikacyjny).

Środowisko naukowe wykazało zainteresowanie wykorzystaniem fagów w połączeniu z antybiotykami już ponad 15 lat temu, gdzie udowodniono, że podejście polegające na wykorzystaniu obu tych czynników jednocześnie może być obiecującym sposobem poprawy ich aktywności przeciwbakteryjnej. Zjawisko to znane jest jako synergia fagów i antybiotyków (ang. phage-antibiotic synergy, PAS) (Comeau i in., 2007). W pracy wyjaśniono, że efekt PAS występuje, gdy subletalne stężenia niektórych antybiotyków znacząco stymulują bakterię gospodarza do produkcji zjadliwego faga. Fagi mogą oferować bardzo potrzebny potencjał do uzupełniania antybiotyków, głównie ze względu na różnice w sposobie ich działania, ale także z powodu niezliczonej różnorodności fagów (Comeau i in., 2007; Torres-Barceló i Hochberg, 2016).

Nanomateriały to struktury wytwarzane w skali nano, których co najmniej jeden wymiar zawiera się w przedziale od 1 do 100 nm, a dzięki korzystnemu stosunkowi pola powierzchni do ich objętości mogą być bardziej aktywne biologicznie niż makrocząstki o takim samym składzie chemicznym. Rozmiary nanomateriałów, zbliżone do elementów subkomórkowych, pozwalają im przenikać przez naturalne bariery, jakimi są błony biologiczne, dzięki czemu po wprowadzeniu do organizmu mogą dotrzeć nawet do najmniejszych naczyń i dowolnych typów komórek (Stark, 2011). Obecnie, ze względu na dużą różnorodność nanomateriałów, ich proponowane zastosowanie obejmuje diagnostykę i leczenie chorób (np.: działanie jako fluorescencyjne znaczniki biologiczne, dostarczanie leków i genów, wykrywanie patogenów i białek czy separacja i oczyszczanie molekuł biologicznych), produkcję materiałów, elektroniki, pozyskiwanie energii czy zastosowanie w obszarach żywności i rolnictwa (Salata, 2004; Khan i in., 2019). Podkreśla się jednak przede wszystkim ich wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową, co stanowi alternatywę dla obecnie stosowanych metod neutralizacji patogenów (Hajipour i in., 2012; Moritz i Geszke-Moritz, 2013). Z kolei, złożoność biochemiczna cząsteczek tworzących wirion faga oraz jego zróżnicowana wielkość wyrażona w skali nanometrycznej sprawiają, że bakteriofagi można również traktować jako naturalne nanocząsteczki zbudowane z cząsteczek o różnym ładunku i hydrofobowości, które mogą oddziaływać także z innymi materiałami, m.in. nanomateriałami (Paczesny i Bielec, 2020).

Kolejnym alternatywnym czynnikiem przeciwdrobnoustrojowym są substancje pochodzenia naturalnego, a w szczególności ekstrakty roślinne. Istnieje stale rosnące zapotrzebowanie na środki lecznicze pochodzenia roślinnego, zarówno w krajach rozwijających się, jak i rozwiniętych, ze względu na rosnące uznanie, że są to produkty naturalne i w większości przypadków łatwo dostępne po przystępnych cenach (Ghosh i in., 2008). Wykorzystanie ekstraktów roślinnych o znanych właściwościach przeciwbakteryjnych, może mieć duże znaczenie w leczeniu chorób wywoływanych zakażeniami bakteryjnymi. Przeciwdrobnoustrojowe właściwości roślin były badane i potwierdzane przez wielu naukowców na całym świecie, wykazując że właściwości te wynikają z obecności związków chemicznych stanowiących produkty metabolizmu wtórnego roślin (Nascimento i in., 2000). Tymi związkami bioaktywnymi są głównie polifenole. Mechanizm ich działania wciąż nie jest w pełni poznany, ale może być związany z ich budową chemiczną. Udowodniono natomiast, że mogą one powodować zmiany morfologiczne komórek mikroorganizmów, uszkadzać ściany komórkowe bakterii oraz wpływać na powstawanie biofilmu (Efenberger-Szmechtyk i in., 2021).

Połączenie prostych, sprawdzonych i ekonomicznie przystępnych, alternatywnych czynników przeciwdrobnoustrojowych, może przyczynić się do opracowania nowatorskich strategii terapeutycznych i biosanitacyjnych wymierzonych w drobnoustroje, także te odporne na konwencjonalnie stosowane terapie.

2. Hipotezy

1. Badania interakcji czynników przeciwdrobnoustrojowych i bakteriofagów litycznych pozwalają na określenie potencjalnych możliwości ich jednoczesnej aplikacji w terapiach łączonych, w ramach alternatywnego podejścia do zwalczania infekcji bakteryjnych (**publikacje D-1, D-2, D-3**).
2. Wybrane czynniki przeciwdrobnoustrojowe mogą wpływać na aktywność bakteriologiczną bakteriofagów (**publikacje D-1, D-2, D-3**).
3. Obserwowane interakcje pomiędzy wybranymi czynnikami przeciwdrobnoustrojowymi mogą mieć zróżnicowany charakter, począwszy od synergistycznego, przez brak obecności znaczących oddziaływań, aż po właściwości antagonistyczne (**publikacje D-1, D-2, D-3**).
4. Różnice w ilości i morfologii policzalnych łysinek fagowych są wyznacznikiem wyboru najefektywniejszej modyfikacji metody podwójnej warstwy do wstępnego wykrywania synergii antybiotyków i fagów (**publikacja D-1**).
5. Wpływ nanocząstek na bipolarny wirion faga z rodzaju *Myoviridae* i wiążące się z tym interakcje zależą od liczbowej wartości potencjału zeta testowanych nanocząstek i w konsekwencji, od miejsca wiązania się nanocząstek do aktywnego litycznie faga (**publikacja D-2**).
6. Wykorzystanie nowoczesnych technik badawczych podczas analizowania interakcji zachodzących w układach złożonych (ekstrakt roślinny–bakteriofag–gospodarz bakteryjny) jest kluczowe z uwagi na różnice w oddziaływaniach w środowisku statycznym oraz dynamicznym i właściwą ocenę właściwości przeciwdrobnoustrojowych badanych czynników (**publikacje D-3, nieopublikowana praca B-1**).
7. Wpływ ekstraktów roślinnych pozyskanych z roślin o znaczeniu rolniczym (jeżówka purpurowa – *Echinacea purpurea* i ruta – *Ruta graveolens*) na przebieg lizy fagowej, zróżnicowanych morfologicznie bakteriofagów litycznych, jest wysoce specyficzny i zależny od stężenia, testowanego gatunku faga i gospodarza bakteryjnego (**publikacja D-3**).

Hipoteza uzupełniająca, dotycząca nieopublikowanej pracy B-1: użycie różnych rodzajów rozpuszczalników (acetonu i metanolu) podczas pozyskiwania ekstraktu ze stewii (*Stevia rebaudiana*) wpływa na wynik interakcji w zależności od testowanych gatunków fagów i gospodarzy bakteryjnych.

3. Cel badawczy

Głównym celem pracy przedstawionej w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego i stanowiących podstawę ubiegania się o stopień naukowy doktora było określenie wpływu wybranych czynników przeciwdrobnoustrojowych na aktywność lityczną bakteriofagów, w kontekście wykrywania ich interakcji o różnym charakterze i potencjalnej

możliwości wykorzystania w aplikacjach łączonych w ramach alternatywnego podejścia do zwalczania infekcji bakteryjnych.

Cele szczegółowe

1. Dobranie najefektywniejszej modyfikacji metody podwójnej warstwy w celu wstępnego wykrywania efektu synergii fagów i antybiotyków poprzez przetestowanie siedmiu różnych wariantów modyfikacji, obejmujących miejsca aplikacji antybiotyku oraz obecność lub brak agaru podstawowego, wykorzystując bakterie *Escherichia coli* oraz bakteriofaga typu T4 jako mikroorganizmy modelowe (**publikacja D-1**).
2. Ocena wpływu sześciu wybranych nanocząstek na aktywność lityczną bakteriofaga typu T4 o złożonej, bipolarnej budowie wirionu, w kontekście obserwacji interakcji oraz związanych z nimi możliwości koaplikacyjnych tych czynników (**publikacja D-2**).
3. Ocena występowania interakcji dobrze scharakteryzowanych bakteriofagów litycznych o różnej charakterystyce (MS2, T4 i phi6) oraz metanolowych ekstraktów roślinnych pozyskanych z ziela jeżówki purpurowej i ruty w środowisku bakteryjnym, w celu zrozumienia ich potencjału aplikacyjnego oraz ewentualnych ograniczeń (**publikacja D-3**).

Cel szczegółowy uzupełniający, dotyczący nieopublikowanej pracy B-1: Ocena występowania interakcji dobrze scharakteryzowanych bakteriofagów litycznych o różnej charakterystyce (MS2, T4 i phi6) oraz ekstraktu roślinnego pozyskanego z ziela stewii za pomocą ekstrakcji metanolowej i acetonowej, w celu określenia wpływu różnych rodzajów rozpuszczalników na aktywność ekstraktów zastosowanych w środowisku bakteryjnym.

4. Materiał i metody badawcze

4.1. Mikroorganizmy

Jako materiał badawczy używano: litycznego bakteriofaga typu T4 (fag T4₅; izolat własny; kolekcja mikroorganizmów Katedry Mikrobiologii i Biotechnologii, ZUT w Szczecinie) oraz szczepu gospodarza bakteryjnego *Escherichia coli* K-12 C600 (kolekcja mikroorganizmów Katedry Mikrobiologii i Biotechnologii, ZUT w Szczecinie) (**publikacja D-1, D-2**); referencyjne bakteriofagi lityczne phi6 (DSM 21518), MS2 (DSM 13767) i T4 (DSM 4505) oraz odpowiadające im szczepy gospodarzy bakteryjnych: *Pseudomonas syringae* (DSM 21482), *Escherichia coli* (DSM 5695) i *Escherichia coli* (DSM 613) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) (**publikacja D-3, nieopublikowana praca B-1**).

4.2. Czynniki przeciwdrobnoustrojowe

- a) **Antybiotyki:** w celu wytypowania dwóch antybiotyków o wyraźnej zdolności generowania synergii do przeprowadzenia eksperymentu różnych wariantów metody podwójnej warstwy, w pierwszej kolejności przetestowano 43 antybiotyki należące do różnych grup:

Tabela 1. Antybiotyki użyte w pierwszej fazie badań

Grupa antybiotyku	Antybiotyk
β-laktamy (penicyliny, cefalosporyny, cefamycyny, karbapenemy, monobaktamy)	Piperacylina
	Amoksycylina
	Amoksycylina/kwas klawulanowy
	Penicylina
	Kloksacylina
	Oksacylina
	Tikarcylicyna
	Piperacylina/tazobaktam
	Cefacetryl
	Ceftazydym
	Cefaleksyna
	Cefoperazon
	Cefuroksym
	Cefotaksym
	Cefpodoksym
Inne (glikopeptydy, polimyksyny)	Meropenem
	Aztreonam
	Cefoksytyl
Aminoglikozydy	Wankomycyna
	Teikoplanina
	Kolistyna
	Gentamycyna
	Amikacyna
Tetracykliny	Tobramycyna
	Streptomycyna
	Kanamycyna
	Doksycyklina
	Tigecyklina
Oksazolidynony	Tetracyklina
	Oksytetracyklina
Streptograminy	Linezolid
Chloramfenikol	Chinoprystyna/dalfoprystyna
Makrolidy	
Linkozamidy	Erytromycyna
	Klindamycyna
Fusydany	Linkomycyna
	Kwas fusydowy
Fluorochinolony	Norfloksacyna
	Ciprofloksacyna
	Marbofloksacyna
Sulfonamidy	Flumechina
Ryfamycyny	Trimetoprim-sulfametoksazol
	Rifampicylina

Do dalszego etapu badań wybrano cefotaksym i ampicylinę (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska) (**publikacja D-1**).

- b) **Nanocząstki:** do badań użyto sześć różnych nanomateriałów – nanosfery krzemionkowe (SiO_2), nanosfery krzemionkowe funkcjonalizowane dwutlenkiem tytanu ($\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$), nanocząstki dwutlenku tytanu (TiO_2), nanocząstki tlenku żelaza (Fe_3O_4), powłoki krzemionkowe na nanocząstkach tlenku żelaza ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$) i powłoki krzemionkowe na nanocząstkach tlenku

żelaza, funkcjonalizowane dwutlenkiem tytanu ($\text{SiO}_2\text{-Fe}_3\text{O}_4\text{-TiO}_2$). Nanomateriały zostały zsyntetyzowane i udostępnione dzięki uprzejmości dr inż. Krzysztofa Cendrowskiego z Katedry Budownictwa Ogólnego, ZUT w Szczecinie oraz prof. dr hab. Ewy Mijowskiej z Katedry Fizykochemii Nanomateriałów, ZUT w Szczecinie (**publikacja D-2**).

- c) **Ekstrakty roślinne:** do badań zostały użyte ekstrakty metanolowe pozyskane z ziela jeżówki purpurowej oraz ruty (**publikacja D-3**) oraz ekstrakty metanolowe i acetonowe pozyskane z ziela stewii (**nieopublikowana praca B-1**). Ekstrakty zostały udostępnione dzięki uprzejmości dr hab. inż. Małgorzaty Mizielińskiej, prof. ZUT z Centrum Bioimmobilizacji i Innowacyjnych Materiałów Opakowaniowych, ZUT w Szczecinie.

4.3. Namnażanie bakteriofagów oraz przygotowanie lizatów

Bakteriofag T4₅: W celu namnożenia dzikiego faga typu T4 użyto płynnej nocnej hodowli gospodarza bakteryjnego, doprowadzonej do $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,5$ (wartość odpowiadająca logarytmicznej fazie wzrostu). Następnie dodawano bakteriofaga i inkubowano do uzyskania widocznej lizy hodowli. W celu oczyszczenia lizatu, dodawano chloroform (10%, obj./obj.), próbki wortexowano a następnie odwirowywano. Supernatant zbierano i analizowano pod względem obecności i aktywności faga za pomocą testu łysinkowego z podwójną warstwą agaru (Kropinski i in., 2009). Klarowną łysinkę zbierano a fagi zawieszono w buforze TM (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgSO_4 przy pH 7,5). Wyizolowane fagi oczyszczano przez potrójne powtórzenie metody i namnażano aż do uzyskania jednorodnych łysinek. Następnie określano miano lizatu fagowego poprzez spot-test rozcieńczeń dziesiętnych na podwójnej warstwie agaru. Lizaty fagowe przechowywano w temperaturze 4°C do czasu dalszych analiz (**publikacja D-1, D-2**).

Bakteriofagi MS2, T4 i phi6: W celu namnożenia litycznych fagów referencyjnych, używano odpowiadających im gospodarzy bakteryjnych, namnożonych w płynnych hodowlach nocnych do osiągnięcia $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,2$ (wartość odpowiadająca logarytmicznej fazie wzrostu). Następnie dodawano fagi i inkubowano aż do wystąpienia widocznej lizy. W celu oczyszczenia lizatów fagów MS2 i T4 dodawano chloroform (10%, obj./obj.), wortexowano a następnie odwirowywano. W celu oczyszczenia lizatu faga phi6 próbki najpierw odwirowywano a następnie sterylizowano przez filtrację (filtr PES, 0,22 μm). Supernatanty kolekcjonowano i określano miano lizatów poprzez spot-test rozcieńczeń dziesiętnych na podwójnej warstwie agaru. Lizaty fagowe przechowywano w temperaturze 4°C do czasu dalszych analiz (**publikacja D-3, nieopublikowana praca B-1**).

4.4. Określanie najefektywniejszej modyfikacji metody podwójnej warstwy agaru w celu uwidocznienia efektu synergii fagów i antybiotyków (PAS)

4.4.1. Wybór antybiotyków wykazujących silny efekt synergii na płytkach Petriego

W celu wykrycia antybiotyków wywołujących efekt PAS, zastosowano 43 różne antybiotyki (4.2. Czynniki przeciwdrobnoustrojowe, podpunkt a)). Badanie wykonano metodą podwójnej warstwy agaru połączonego z oznaczeniem antybiotykowrażliwości za pomocą testu dyfuzyjno-krażkowego zgodnie z zaleceniami Clinical and Laboratory Standards Institute

(CLSI). Płytki z agarem podstawowym (1,5%) pokrywano agarem górnym (0,7%) zawierającym hodowlę bakteryjną gospodarza oraz lizatu fagowy. Po zestaleniu wierzchniego agaru nakładano krążki antybiotykowe. Płytki inkubowano a następnie analizowano pod kątem obecności efektu PAS według Comeau i in. (2007). Efekt był określany jako obecność istotnie większych łysinek fagowych w porównaniu z kontrolą, w strefach otaczających krążki antybiotykowe, gdzie występowało subletalne stężenie leku (**publikacja D-1**).

4.4.2. *Określanie wrażliwości gospodarza bakteryjnego na wybrane antybiotyki*

Badanie wykonywane było w celu określenia minimalnych stężeń hamujących (ang. minimal inhibitory concentration – MIC) wybranych antybiotyków, aby określić ich subletalne stężenia, potrzebne do dalszych analiz. Na podstawie poprzedniego eksperymentu wybrano cefotaksym i ampicylinę. Roztwory podstawowe antybiotyków przygotowywano przez rozcieńczenie ich w wodzie dejonizowanej i sterylizację poprzez filtrację (filtr strzykawkowy PES, 0,2 µm). Wartości MIC antybiotyków określono stosując protokół rozcieńczeń na mikroplytkach 96-dołkowych (Weigand i in., 2008) (**publikacja D-1**).

4.4.3. *Wybór modyfikacji metody podwójnej warstwy agaru*

W celu oceny występowania efektu synergii fag-antybiotyk (PAS) przetestowano różne warianty modyfikacji metody podwójnej warstwy agaru, wraz z odpowiadającymi im płytkami kontrolnymi. Warianty obejmowały:

- dodanie antybiotyku do agaru górnego z obecnością agaru dolnego lub bez obecności agaru dolnego, wraz z płytkami kontrolnymi bez antybiotyków (standardowa metoda podwójnej warstwy agaru oraz warstwa pojedyncza agaru górnego),
- dodanie antybiotyku do agaru dolnego z obecnością agaru górnego wraz z płytkami kontrolnymi bez dodatku antybiotyków (standardowa metoda podwójnej warstwy agaru),
- dodanie antybiotyku w postaci krążków antybiotykowych naniesionych na płytki z górnym i dolnym agarem, lub tylko z agarem górnym, wraz z płytkami kontrolnymi bez dodatku antybiotyków (standardowa metoda podwójnej warstwy agaru oraz warstwa pojedyncza agaru górnego).

Wszystkie warianty zawierały agar górny z dodatkiem lizatu fagowego bakteriofaga T4₅ oraz zawiesiny gospodarza bakteryjnego *E. coli* K-12 C600. Eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach (**publikacja D-1**).

4.5. Określenie wpływu wybranych nanocząstek na wiriony faga litycznego typu T4 oraz obserwacja interakcji

4.5.1. Charakterystyka nanocząstek: analiza mikroskopowa, potencjały zeta i przygotowanie zawiesin roboczych

Wizualizacji nanomateriałów dokonywano za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) (Tecnai G2 F20 S-TWIN; FEI, Hillsboro, OR, USA). W celu scharakteryzowania struktury krystalicznej próbek zastosowano proszkowy dyfraktometr rentgenowski (XRD). Do analizy potencjału zeta użyto Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) z czerwonym laserem 633 nm. Wszystkie próbki nanocząstek zawieszono w wodzie dejonizowanej poddawano działaniu ultradźwięków przez 30 min, bezpośrednio przed pomiarami. Pomiar każdej z próbek wykonywany był w trzech powtórzeniach. Analizy wykonano we współpracy z Katedrą Fizykochemii Nanomateriałów, ZUT w Szczecinie. W celu przygotowania zawiesin wyjściowych niezbędnych do dalszych badań, nanocząstki umieszczano w szklanych probówkach zawieszano w sterylnej wodzie dejonizowanej do uzyskania stężenia 10 mg/100 μ L w każdej próbce. Probki dokładnie worteksowano a następnie poddawano działaniu ultradźwięków w kąpeli ultradźwiękowej w celu zapewnienia jednorodnej dyspersji cząstek (**publikacja D-2**).

4.5.2. Ocena zdolności łysinkowania litycznego faga typu T4 koinkubowanego z wybranymi nanocząstkami

W celu zbadania zdolności faga T4₅ do tworzenia łysinek w obecności nanocząstek przeprowadzono test koinkubacji, poprzez dodawanie nanocząstek w trzech różnych stężeniach do lizatu fagowego zawieszonego w buforze TM na 12-dołkowych płaskodennych płytach polistyrenowych. Bufor TM z lizatem fagowym i dejonizowaną wodą wolną od nanocząstek zastosowano jako kontrolę. Płytki następnie inkubowano w temperaturze pokojowej (22°C) na wytrząsarce orbitalnej (160 rpm) i pobierano cyklicznie próbki, których supernatant po odwirowaniu наносono na płytki Petriego z agarem dwuwarstwowym, w celu późniejszej analizy obecności łysinek fagowych. Eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach (**publikacja D-2**).

4.5.3. Ocena aktywności litycznej faga typu T4 eksponowanego na działanie wybranych nanocząstek w kulturach płynnych

W celu zbadania zdolności faga T4₅ do lizy gospodarza bakteryjnego w hodowli płynnej w towarzystwie wybranych nanocząstek, odświeżoną hodowlę *E. coli* K-12 C600 наносono na 12-dołkowe płaskodenne płytki polistyrenowe i pozostawiono do osiągnięcia logarytmicznej fazy wzrostu ($OD_{600nm} = 0,2$) na wytrząsarce orbitalnej (160 rpm). Następnie hodowlę zakażano fagiem przy MOI (ang. multiplicity of infection) = 0,1 i dodawano nanocząstki do uzyskania końcowych stężeń 0,5, 0,1 i 0,05 mg/mL. Pomiary OD_{600nm} wykonywano co 30 minut, zbierając supernatant do 96-dołkowych płaskodennych płytek polistyrenowych, aby uniknąć fałszywych pomiarów powodowanych przez nanocząsteczki. Pożywkę zastosowano jako próbę ślepą, hodowlę bakteryjną z buforem wolnym od fagów i wodę dejonizowaną wolną od nanocząstek zastosowano jako kontrolę wzrostu *E. coli* K-12 C600, a hodowlę bakteryjną z lizatem

fagowym i wodą dejonizowaną wolną od nanocząstek zastosowano jako kontrolę lizy. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach (**publikacja D-2**).

4.5.4. Wyznaczanie okresu eklipsy litycznego faga typu T4 eksponowanego na działanie wybranych nanocząstek

W celu oceny czasu pomiędzy infekcją fagową a pojawieniem się plonu fagowego w komórce bakterii w obecności nanocząstek, wyznaczano okresy eklipsy faga będące częścią jednostopniowego cyklu rozwojowego (ang. one-step growth). Płynną hodowlę gospodarza doprowadzano do $OD_{600nm} = 0,5$, następnie odwirowano a osad komórkowy zawieszono w świeżej pożywce. Hodowlę zakażano fagiem przy $MOI = 0,01$ i inkubowano z wytrząsaniem (160 rpm). Następnie hodowlę zainfekowanych komórek odświeżano w bulionie z użyciem 12-dółkowych płaskodennych płytek polistyrenowych i dodawano nanocząsteczki do uzyskania końcowych stężeń 0,5, 0,1 i 0,05 mg/mL. Płytki inkubowano z wytrząsaniem (160 rpm). Próbki zbierano co 2 minuty, traktowano chloroformem (10%, obj./obj.), worteksowano, a następnie odwirowywano. Supernatanty analizowano pod kątem liczby bakteriofagów za pomocą metody miareczkowania na podwójnej warstwie agarowej. Eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach (**publikacja D-2**).

4.5.5. Wizualizacja mikroskopowa interakcji litycznego faga typu T4 oraz wybranych nanocząstek

W celu oczyszczenia wirionów do wizualizacji, do lizatu fagowego dodawano glikol polietylenowy (PEG) 8000 z NaCl i dokładnie mieszano przez odwracanie. Mieszanie przechowywano przez noc w temperaturze 4°C, aby umożliwić cząsteczkom faga precypitację. Próbkę poddano wirowaniu, a następnie ostrożnie odrzucono supernatant, a osad delikatnie zawieszono w buforze TM i pozostawiono na noc w temperaturze 4°C. Następnie usuwano PEG8000 i ekstrahowano cząstki fagowe dodając do próbki chloroform, worteksując i końcowo wirując. Fazę górną zawierającą fagi dalej oczyszczano przez filtrację przez filtr PES 0,22 µm. W celu określenia morfologii wirionu fagowego, próbkę наносono na siatki miedziane powlekanie mieszaniną formvar-węgiel i barwiono roztworem UranyLess (Delta Microscopies, Mauressac, Francja). W celu wizualizacji interakcji fag-nanocząstki, oczyszczone wiriony faga T4₅ mieszano z najwyższymi testowanymi stężeniami nanocząstek (0,5 mg/mL) przed nanoszeniem na siatki i barwieniem. Próbki poddawano obserwacji za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM; Tecnai G2 F20 S-TWIN; FEI, Hillsboro, OR, USA). Analizy wykonano we współpracy z Katedrą Fizykochemii Nanomateriałów, ZUT w Szczecinie (**publikacja D-2**).

4.6. Określanie wpływu ekstraktów roślinnych na referencyjne bakteriofagi lityczne

4.6.1. Przygotowanie ekstraktów roślinnych

Ekstrakty z ziela jeżówki purpurowej i ruty. W celu przygotowania ekstraktów roślinnych z ziela jeżówki purpurowej oraz ruty, użyto metody ekstrakcji metanolem. Suszone

zioła (nadziemne części *Echinacea purpurea* (L.) Moench i *Ruta graveolens*) umieszczano w szklanych butelkach i zalewano 70% wodnym roztworem metanolu (MeOH). Następnie próbki umieszczano w wytrząsarce i ekstrahowano przez 2 godziny w temperaturze 70°C przy 150 obr./min. Surowe ekstrakty metanolowe przesączano przez lejek Büchnera wyposażony w filtr celulozowy. Ekstrakty następnie zateżono przez odparowanie w temperaturze 50°C w celu uzyskania roztworów wodnych. Po odparowaniu metanolu próbki sterylizowano przez filtrację (PES, 0,22 µm), a następnie wykorzystywano do dalszych doświadczeń (**publikacja D-3**).

Dodatkowo, w **nieopublikowanej pracy B-1** użyto ekstraktów roślinnych z ziela stewii (*Stevia rebaudiana*), przygotowanych za pomocą dwóch metod ekstrakcji – metanolem i acetonem. Ekstrakty przygotowywano analogicznie jak w publikacji **D-3**.

Ekstrakty przygotowywano we współpracy z Centrum Bioimmobilizacji i Innowacyjnych Materiałów Opakowaniowych, ZUT w Szczecinie.

4.6.2. Ocena wpływu ekstraktów roślinnych na komórki gospodarzy bakteryjnych

W celu określenia wpływu ekstraktów roślinnych na bakterie, wykorzystano zmodyfikowany protokół seryjnych rozcieńczeń na 96-dołkowych płytkach mikrotitracyjnych, wyznaczający minimalne stężenia hamujące (MIC) (Weigand i in., 2008). Płynne hodowle gospodarzy bakteryjnych inkubowano z wytrząsaniem (160 rpm) aż do osiągnięcia $OD_{600nm} = 0,2$. Dwukrotne seryjne rozcieńczenia ekstraktów (50 – 0,003%) nanoszono na 96-dołkowe płaskodenne płytki polistyrenowe, a następnie dodawano zawiesiny gospodarzy bakteryjnych. Jako kontrolę pozytywną (kontrolę wzrostu bakterii) zastosowano dodatek sterylnej wody dejonizowanej. Następnie próbki inkubowano przez 24 godziny w temperaturach odpowiednich dla badanych bakterii. Wartości gęstości optycznych mierzono przy użyciu czytnika mikroplatek Infinite 200 PRO NanoQuant. Eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach (**publikacja D-3, nieopublikowana praca B-1**).

4.6.3. Ocena wpływu ekstraktów roślinnych na aktywność i zdolność lysinkowania referencyjnych fagów litycznych

W celu zbadania bezpośrednich interakcji fagów i ekstraktów, a mianowicie wpływu ekstraktów na zdolność tworzenia lysinek i miano bakteriofagów, przeprowadzono test koinkubacji. Lizaty fagowe nanoszono na 12-dołkowe płaskodenne płytki polistyrenowe a następnie dodawano ekstrakty roślinne do uzyskania końcowych stężeń w zakresie 50 – 0,049% (dwukrotne seryjne rozcieńczenia). Jako kontrolę pozytywną zastosowano lizaty fagowe i pozbawioną ekstraktu wodę dejonizowaną. Płytki inkubowano w temperaturze pokojowej (20°C) bez dostępu światła. Następnie pobierano próbki, które miareczkowano w buforze TM na płytkach z podwójną warstwą agaru. Eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach (**publikacja D-3, nieopublikowana praca B-1**).

4.6.4. *Stechiometrie interakcji ekstraktów roślinnych i referencyjnych fagów litycznych w środowisku gospodarzy bakteryjnych*

Stechiometrie interakcji fagów i ekstraktów przeprowadzano zgodnie z metodą zaproponowaną przez Gu Liu i in. (2020), z niewielkimi modyfikacjami własnymi. Całonocne hodowle płynne gospodarzy bakteryjnych rozcieńczano w bulionie LB, w celu uzyskania $OD_{600nm} = 1$. Następnie zawiesiny bakteryjne nanoszono na 96-dołkową płaskodenną płytkę polistyrenową, którą uprzednio zaszczepiano różnymi stężeniami bakteriofagów ($10^2 - 10^8$ PFU (ang. plaque-forming unit)/mL) i ekstraktów (25 – 0, 049%) – test szachownicy (ang. checkerboard method). Płytki inkubowano a wartości OD_{600nm} mierzono przy użyciu czytnika mikropłytetek Infinite 200 PRO NanoQuant. Następnie w celu zbadania aktywności metabolicznej bakterii, do próbek dodawano resazurynę i kontynuowano inkubację bez dostępu światła. Ostatnim etapem było przeprowadzenie pomiarów fluorescencji próbek (Synergy HTX, BioTek, Winooski, VT, USA). Eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach (**publikacja D-3, nieopublikowana praca B-1**).

4.6.5. *Infekcja fagowa i profile lizy referencyjnych fagów litycznych z dodatkiem ekstraktów roślinnych w środowisku gospodarzy bakteryjnych*

Na podstawie wyników eksperymentu synogramów statycznych (bez mieszania), wybrano kombinacje, w których występowały interesujące zjawiska (zwiększona aktywność bakterii w teście resazuryny przy jednoczesnym pomiarze OD_{600nm} wykazującym zmniejszenie biomasy bakteryjnej), aby przeanalizować wpływ terapii łączonej ekstraktów i fagów na tempo wzrostu gospodarzy bakteryjnych w czasie rzeczywistym, w środowisku dynamicznym (warunki z mieszaniem). Aby zachować eksperymentalne założenia testu synogramów, nocne hodowle gospodarzy rozcieńczono w bulionie, w celu uzyskania $OD_{600nm} = 1$. Następnie zawiesiny przenoszono do probówek typu Falcon i dodawano lizaty fagowe oraz poszczególne stężenia ekstraktów roślinnych. Uwzględniono również kontrole odniesienia – kontrole ekstraktów, kontrole lizy fagowej i kontrole wzrostu gospodarzy bakteryjnych. Następnie próbki inkubowano z mieszaniem (150 rpm) i zmierzono wartości OD_{850nm} w czasie rzeczywistym przy użyciu bioreaktorów BioSan (BS-010160-A04, BioSan, Ryga, Łotwa) (**publikacja D-3, nieopublikowana praca B-1**).

4.6.6. *Wizualizacja wpływu ekstraktów roślinnych i referencyjnych fagów litycznych na komórki gospodarzy bakteryjnych*

Obrazowanie wykonane za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) przeprowadzono jako dodatkowy test, w celu wizualizacji liczby bakterii i ich kondycji podczas eksperymentów profilów lizy fagowej. Do tego testu wybrano gospodarza *P. syringae* i faga phi6, wraz z najniższym badanym stężeniem ekstraktu jeżówki purpurowej (0,049%). Jako kontrolę lizy zastosowano faga phi6 z dodatkiem komórek *P. syringae*. Doświadczenia z profilem lizy fagowej powtórzono w próbach o mniejszej objętości w probówkach Eppendorf. Po inkubacji mieszanin w probówkach zanurzono siatki miedziane powlekane węglem (400 mesh) i pozostawiono na 30 minut w celu umożliwienia adhezji. Po wysuszeniu siatek próbki utrwalano za pomocą 2% aldehydu glutarowego w 0,1 M kakodylanu sodu (NaCac) (pH 7,4). Następnie próbki przemywano 0,1 M kakodylanem sodu i odwadniano w seryjnych stężeniach lodowatego metanolu w odstępach 1-godzinnych. Probki umieszczano na szalce Petriego i

pokrywano cienką warstwą złota w temperaturze pokojowej (Quorum Technologies Q150R S, Laughton, East Sussex, Wielka Brytania). Następnie próbki oglądano pod skaningowym mikroskopem elektronowym (SEM). Analizę mikroskopową przeprowadzono przy użyciu mikroskopu Vega 3 LMU (Tescan, Brno-Kohoutovice, Czechy). Analizy wykonano we współpracy z Centrum Bioimmobilizacji i Innowacyjnych Materiałów Opakowaniowych, ZUT w Szczecinie (**publikacja D-3**).

4.7. Analiza statystyczna

Wszystkie dane przedstawiano jako średnie z odchyleniami standardowymi (SD), uzyskane z co najmniej trzech niezależnych pomiarów.

Analiza wyników w publikacji D-1: Wyniki analizowano statystycznie za pomocą Statistica 13.3 TIBCO Software Inc. (Stat-Soft Inc., Tulsa, OK, USA). Do oceny normalności rozkładu zmiennych wykorzystano test Shapiro-Wilka. Wykonano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) a istotność różnic między średnimi wartościami liczby łysinek fagowych obliczono za pomocą parametrycznego testu post-hoc Tukeya. Różnice uznano za istotne przy $p \leq 0,05$.

Analiza wyników w publikacji D-2: Wyniki analizowano statystycznie za pomocą GraphPad Prism 8.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Do statystycznej analizy wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) a istotność różnic między średnimi obliczono za pomocą testu post-hoc Dunnetta. Różnice uznano za istotne przy $p \leq 0,05$.

Analiza wyników w publikacji D-3 i w nieopublikowanej pracy B-1: Wyniki analizowano statystycznie za pomocą GraphPad Prism 8.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Do statystycznej analizy wyników zastosowano jednoczynnikową (badania antymikrobiologiczne ekstraktów roślinnych) i dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) (test koinkubacji ekstraktów i fagów) a istotność różnic między średnimi obliczono za pomocą testu post-hoc Dunnetta. Różnice uznano za istotne przy $p \leq 0,05$.

5. Uzyskane wyniki badań

Wykonane badania podzielone zostały na poszczególne zagadnienia badawcze, korespondujące z wybranym czynnikiem przeciwdrobnoustrojowym:

Zagadnienie 1. Koaplikacja antybiotyków i bakteriofagów litycznych: „Modyfikacje metody agaru dwuwarstwowego (DLA) dla pierwszego etapu identyfikacji synergii fag-antybiotyk (PAS)”, ang: „Double-layer agar (DLA) modifications for the first step of the phage-antibiotic synergy (PAS) identification” (**publikacja D-1**).

Zagadnienie to obejmowało określenie najefektywniejszej modyfikacji metody podwójnej warstwy agaru w celu uwidocznienia efektu synergii fagów i antybiotyków, w tym analizy:

- Wyboru antybiotyków wykazujących silny efekt synergii z fagami na płytkach Petriego.
- Określenie wrażliwości gospodarza bakteryjnego na wybrane antybiotyki.

- Wybór modyfikacji metody podwójnej warstwy agaru.

Zagadnienie 2. Koaplikacja nanomateriałów i bakteriofagów litycznych: „Nanocząstki wpływają na aktywność litycznego faga typu T4 *in vitro*”, ang: „Nanoparticles influence lytic phage T4-like performance *in vitro*” (**publikacja D-2**).

Zagadnienie to obejmowało określenie wpływu wybranych nanocząstek na wiriony faga litycznego typu T4 oraz obserwację interakcji, w tym analizy:

- Charakterystyki nanocząstek: analiza mikroskopowa i potencjały zeta.
- Oceny zdolności łyśnięcia litycznego faga typu T4 koinkubowanego z wybranymi nanocząstkami.
- Oceny aktywności litycznej faga typu T4 ekspozowanego na działanie wybranych nanocząstek w kulturach płynnych.
- Wyznaczania okresu eklipsy litycznego faga typu T4 ekspozowanego na działanie wybranych nanocząstek.
- Wizualizacji mikroskopowej interakcji litycznego faga typu T4 oraz wybranych nanocząstek.

Zagadnienie 3. Koaplikacja ekstraktów roślinnych i bakteriofagów litycznych: „Kombinacje ekstraktów roślinnych jeżówki purpurowej (*Echinacea purpurea*) i ruty (*Ruta graveolens*) z fagami litycznymi: badanie interakcji”, ang: „Combinations of echinacea (*Echinacea purpurea*) and rue (*Ruta graveolens*) plant extracts with lytic phages: a study on interactions” (**publikacja D-3**).

Zagadnienie to obejmowało określenie wpływu wybranych ekstraktów roślinnych na referencyjne bakteriofagi lityczne, w tym analizy:

- Oceny wpływu ekstraktów roślinnych na komórki gospodarzy bakteryjnych.
- Oceny wpływu ekstraktów roślinnych na aktywność i zdolność łyśnięcia referencyjnych fagów litycznych.
- Stechiometrii interakcji ekstraktów roślinnych i referencyjnych fagów litycznych w środowisku gospodarzy bakteryjnych.
- Infekcji fagowej i profilów lizy referencyjnych fagów litycznych z dodatkiem ekstraktów roślinnych w środowisku gospodarzy bakteryjnych.
- Wizualizacji wpływu ekstraktów roślinnych i referencyjnych fagów litycznych na komórki gospodarzy bakteryjnych.

Zagadnienie 1. (publikacja D-1)

Eksperymenty wyboru antybiotyków wykazujących silny efekt synergii na płytkach Petriego przeprowadzono opierając się na wytycznych opracowanych przez Comeau i in. (2007). W wyniku tego doświadczenia, spośród 43 testowanych antybiotyków, do kolejnego etapu badań wytypowano cefotaksym i ampicylinę. Antybiotyki te spowodowały zwiększoną ilość morfologicznie większych (niż standardowe) łyśnięk faga T4₅, w obrębie stref zahamowania wzrostu bakterii wywołanych antybiotykiem – efekt wskazujący na synergia.

Wrażliwość komórek *E. coli* na dwa wybrane antybiotyki określono jako wartości MIC. Średnie wartości MIC cefotaksymu i ampicyliny, obserwowane dla testowanego szczepu bakteryjnego, wynosiły odpowiednio 0,0225 µg/mL i 390,625 µg/mL. Ponieważ synergia jest

obserwowana jako znacznie zwiększone morfologicznie łysinki fagowe w strefach otaczających krążki antybiotykowe w których występuje subletalne stężenie leku wywnioskowano, że optymalne stężenia antybiotyków dla skutecznego wizualizowania efektu PAS to „sub-MIC” (ang. sublethal minimal inhibitory concentration) (Ryan i in., 2012). Stężenia te ustalono na 0,5 MIC wyjściowego (dla cefotaksymu 0,011 µg/mL, a dla ampicyliny 195,3 µg/mL) i wykorzystano w dalszych eksperymentach.

W badaniu wyboru najlepszego wariantu metody podwójnej warstwy agaru, przetestowano pięć różnych modeli metod wraz z odpowiednimi kontrolami, uzyskując siedem różnych wariantów. W badaniach wykazano, że całkowita liczba łysinek fagowych na płytkach zależała głównie od zastosowanego antybiotyku. Test z użyciem ampicyliny wykazał mniejsze zróżnicowanie między wynikami z różnych modyfikacji metody, w przeciwieństwie do testu z użyciem cefotaksymu. Dodatek ampicyliny nie spowodował znaczących różnic w liczbie łysinek w żadnej z modyfikacji metody w porównaniu z kontrolą bez antybiotyku, mimo że był w stanie wywołać efekt PAS w badaniu przesiewowym. Jednak dodatek cefotaksymu spowodował istotne zmiany liczby łysinek w zależności od rodzaju modyfikacji metody. Największą łączną liczbę łysinek uzyskano podczas dodawania antybiotyku do agaru dolnego w obecności agaru górnego. Ta modyfikacja zwiększyła liczbę łysinek o 114% w porównaniu z użyciem samego agaru górnego i o 37% w porównaniu z metodą standardową. Wyniki badania analizowane pod kątem liczby łysinek fagowych podzielonych na zakresy średnic wykazały statystycznie istotne różnice między rodzajem zastosowanej metody a rozmiarami łysinek. Udowodniono, że dodatek cefotaksymu skutkowało większą liczbą standardowych łysinek faga T4₅ średniej wielkości (0,51-1 mm) i dużych łysinek wskazujących na PAS (1,01-1,5 mm), ale mniejszą ilością małych, standardowych łysinek (<0,5 mm) w porównaniu z dodatkiem ampicyliny. Ponadto, najlepsze wyniki uzyskano również podczas dodawania antybiotyku do dolnego agaru w obecności agaru górnego oraz przy aplikacji krążków antybiotykowych na standardowy wariant metody agaru dwuwarstwowego. Niemniej jednak dodanie antybiotyków w formie płynnej, niezależnie od zastosowanej modyfikacji metody, zwiększyło ogólną liczbę łysinek średniej wielkości, podczas gdy zastosowanie krążków z antybiotykiem zwiększyło ogólną liczbę dużych łysinek wskazujących na PAS.

W badaniach udowodniono, że chociaż antybiotyk może wykazywać efekt PAS z fagiem typu T4 standardową metodą krążkową, to należy przeprowadzić dalsze badania w celu sprawdzenia, czy efekt będzie równie zadowalający przy zastosowaniu antybiotyku bezpośrednio do agaru. Cefotaksym zwiększył całkowitą liczbę łysinek fagowych, podczas gdy ampicylina nie wykazała tego efektu, pomimo przynależności do tej samej grupy antybiotyków (β-laktamowych). Jednak ampicylina należy do grupy penicylin, a cefotaksym do cefalosporyn, a jak donoszą inni autorzy, interakcje synergistyczne i antagonistyczne fagów, i antybiotyków zależą w dużej mierze od mechanizmu inhibicji bakteryjnej, i stechiometrii tych par (Gu Liu i in., 2020), a cefotaksym zwykle posiada szersze spektrum działania w porównaniu z ampicyliną (Payne i Ericson, 2019). Również wybór wariantu metody DLA okazał się być w większości zależny od rodzaju antybiotyku w odniesieniu do konkretnego bakteriofaga i gospodarza bakteryjnego. Aby zwizualizować efekt PAS, najlepsze wyniki uzyskano za pomocą modyfikacji z użyciem krążków antybiotykowych, natomiast w celu uzyskania największej ilości zróżnicowanych morfologicznie łysinek, najefektywniejszym wariantem była aplikacja antybiotyku bezpośrednio do agaru dolnego, co mogło wynikać przede wszystkim z powolnej dyfuzji leku do strefy wzrostu bakterii.

Zagadnienie 2. (publikacja D-2)

W ramach badań prowadzonych we współpracy z Katedrą Fizykochemii Nanomateriałów ZUT przetestowano wpływ wybranych nanocząstek na aktywność lityczną faga typu T4. Testowane nanocząstki charakteryzowały się dużą czystością i dużą powierzchnią właściwą. Analiza potencjału zeta (ZP) wykazała, że spośród wszystkich badanych materiałów, największe maksymalne i minimalne ładunki potencjału zeta miały dwutlenek tytanu (TiO_2 , 36 mV) oraz nanosfery krzemionkowe (SiO_2 , -51 mV). Krzemionka funkcjonalizowana ditlenkiem tytanu również wykazała ładunek ujemny ($\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$, -25 mV). Nanocząstki tlenku żelaza wykazywały natomiast nieznacznie ujemny ładunek potencjału zeta, bliski potencjałowi neutralnemu (Fe_3O_4 , -1,1 mV). Ze względu na połączenie rdzeni z tlenku żelaza i powłoki krzemionkowej, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ wykazywał mocno ujemny ładunek (-37 mV). Mimo, że dwutlenek tytanu charakteryzował się najwyższym ładunkiem dodatnim, w połączeniu z wysoce ujemnie naładowaną krzemionką i prawie pasywnym ładunkiem tlenku żelaza, cząsteczki $\text{SiO}_2\text{-Fe}_3\text{O}_4\text{-TiO}_2$ wykazywały ładunek ujemny (-19 mV).

Testy mikrobiologiczne pozwoliły na określenie wpływu nanocząstek na faga T4₅, natomiast analiza mikroskopowa TEM pozwoliła na wyjaśnienie obserwowanych zjawisk. Wyniki eksperymentu koinkubacji wykazały, że najbardziej zauważalne różnice w zdolności faga do tworzenia łąsin wystąpiły w czasie 0 — bezpośrednio po dodaniu nanocząstek do lizatu fagowego. Najwyższe stężenie nanocząstek (0,5 mg/mL) skutkowało wyraźnymi zmianami w widoczności łąsin dla większości analizowanych próbek. W eksperymencie oceny aktywności litycznej faga eksponowanego na działanie wybranych nanocząstek w kulturach płynnych, wydajność lityczną oceniano przez analizę pola powierzchni pod krzywymi lizy po 180, 210 i 240 minutach inkubacji, kiedy różnice pomiędzy badanymi próbkami były najbardziej wyraźne. Najszybsze i najbardziej znaczące zmiany aktywności litycznej faga zaobserwowano przy najwyższym (0,5 mg/mL) stężeniu nanocząstek, natomiast największe różnice procentowe wystąpiły po 240 minutach inkubacji. W porównaniu z kontrolą lizy, dodatek TiO_2 , $\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$, Fe_3O_4 i $\text{SiO}_2\text{-Fe}_3\text{O}_4\text{-TiO}_2$ skutkowało zwiększoną wydajnością lityczną faga, natomiast po aplikacji $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ i SiO_2 odnotowano zmniejszenie aktywności litycznej faga. Wyznaczanie okresów eklipsy faga eksponowanego na działanie wybranych nanocząstek pozwoliło na ocenę czasu pomiędzy infekcją a pojawieniem się plonu fagowego w komórce. Wykazano, że niezależnie od zastosowanego stężenia nanocząstek, obecność większości z nich skutkowało szybszą i większą produkcją fagowych cząstek potomnych w porównaniu z kontrolą, już po 12 minutach inkubacji. Obrazowanie TEM potwierdziło klasyfikację badanego faga do rzędu *Caudovirales* i rodziny *Myoviridae* na podstawie typowych cech morfologicznych. Za pomocą zdjęć udowodniono, że bakteriofag w obecności SiO_2 łączył się elektrostatycznie z ujemnie naładowanymi nanosferami, dodatnio naładowanymi ogonkami fagowymi. Kiedy nanosfery pokryto nanocząstkami tytanu ($\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$), nastąpiło niespecyficzne wiązanie się faga – wiriony faga przyłączały się ujemnie naładowanymi główkami, jak również dodatnio naładowanymi ogonkami. W obecności dodatnio naładowanego TiO_2 fag T4₅ łączył się z nanocząstkami przez ujemnie naładowaną główkę. Gdy badanego bakteriofaga analizowano w połączeniu z Fe_3O_4 , fag ponownie przyłączał się niespecyficznym do nanomateriału o ładunku zbliżonym do neutralnego. Obecność nanomateriału złożonego ($\text{SiO}_2\text{-Fe}_3\text{O}_4\text{-TiO}_2$) również skutkowało zróżnicowanym wiązaniem się faga. Nanocząsteczki Fe_3O_4 pokryte porowatą krzemionką ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$) o całkowitym ładunku ujemnym powodowały przyłączenie się faga za pomocą ogonka.

Podsumowując, w badaniach udowodniono, że nanocząstki o ujemnym ZP powodują przyczepianie się faga za pomocą jego włókien ogonka – stąd też ogonkowa adsorpcja faga do nanocząstki ogranicza zdolność faga do wiązania naturalnych celów (bakterii). Jednak w

niektórych przypadkach wykazano wznowienie aktywności fagowej (zdolność do tworzenia łyśinek), gdy fag odłączał się od nanocząstki i zostawał usunięty z jej środowiska. Nie nastąpiły żadne trwałe zmiany w aktywności fagowej, które powodowałyby zahamowanie późniejszej infekcji fagowej. Zaobserwowano również zwiększoną aktywność lityczną faga w obecności nanocząstek. Tak było w przypadku, gdy fag przyłączał się do dodatnio naładowanych nanocząstek za pomocą główki i gdy zachodziło niespecyficzne wiązanie faga, co może wskazywać na działanie synergistyczne kompleksów fag–nanocząstka. Ogólnie wykazano, że sama obecność ładunku nanocząstki, ujemnego lub dodatniego, nie wystarczy aby fag przyłączał się do nich w sposób specyficzny i w konsekwencji wpłynął na działanie faga. Największy wpływ na obserwowane interakcje ma wartość potencjału zeta nanocząstki – nanomateriały o ZP niższym niż 35 [mV] skutecznie wiążą się elektrostatycznie z dodatnio naładowanymi ogonkami faga, natomiast cząsteczki o ZP wyższym niż 35 [mV] skutecznie wiążą się z ujemnie naładowanymi główkami faga. Gdy nanocząstki nie spełniają tych wymagań, fizyczne oddziaływanie fag–nanocząstka staje się niespecyficzne. Konsekwencje oddziaływania między fagami a nanocząstkami można przewidzieć na podstawie ładunków cząstek wyrażonych w wartościach ZP.

Obserwacje te są zgodne z wynikami badań innych autorów – Cademartiri i in. (2010) donieśli, że ogonkowe fagi *Myoviridae* i *Siphoviridae* będą skutecznie adsorbować do porowatych sfer krzemionkowych, które stają się kationowe lub anionowe przez modyfikację ich powierzchni. W przytoczonej pracy fagi nie adsorbowały skutecznie na powierzchniach zmodyfikowanych grupami obojętnymi, a liczba fagów zakaźnych związanych z krzemionką była zwiększona przez obecność powierzchni jonowych, przy czym większy ładunek powierzchniowy korelował z większym stężeniem adsorbowanych fagów. Przyczepność elektrostatyczna została również przetestowana przez Richtera i in. (2021), którzy opracowali nanocząsteczki złota pokryte ujemnie naładowaną mieszaniną, które dezaktywowały różne typy selektywnych fagów *Escherichia coli*: T1, T4 i T7. Ponadto, potwierdzono znaczenie sił elektrostatycznych, ponieważ nienaładowane nanocząstki nie wykazywały żadnego wpływu we wszystkich analizowanych przypadkach.

Zagadnienie 3. (publikacja D-3)

W ramach badań prowadzonych we współpracy z Centrum Bioimmobilizacji i Innowacyjnych Materiałów Opakowaniowych ZUT przetestowano wpływ wybranych ekstraktów roślinnych na aktywność lityczną fagów referencyjnych.

Ocena wpływu ekstraktów roślinnych na komórki gospodarzy bakteryjnych ujawniła zróżnicowane wyniki. Ekstrakt z jeżówki spowodował wzrost ilości biomasy bakteryjnej *E. coli* DSM 613, podczas gdy dla *E. coli* DSM 5695 efekt stymulujący występował jedynie do stężenia 1,56%. Niższe stężenia nie miały wpływu na wzrost wszystkich badanych bakterii lub w nielicznych przypadkach go hamowały. Ekstrakt z ruty również wykazywał stymulujący wpływ na komórki obu szczepów *E. coli* w większości badanych stężeń, z wyjątkiem najwyższego stężenia. Dodatek ekstraktu z ruty do komórek *P. syringae* DSM 21482 spowodował najbardziej zróżnicowane wyniki, wykazując zarówno działanie stymulujące, jak i hamujące.

W eksperymencie koinkubacji fagów i ekstraktów również wykazano zróżnicowane wyniki – dodatek ekstraktu z jeżówki i ruty nie wpłynęły znacząco na liczebność fagów MS2, z wyjątkiem dwóch stężeń (12,5% i 1,56% - jeżówka; 0,19% i 0,097% - ruta), które spowodowały efekt stymulujący w postaci zwiększonej ilości łyśinek fagowych. W stosunku do faga phi6, najwyższe stężenia ekstraktu z jeżówki (50%, 25% i 12,5%) wywoływały efekt antyfagowy,

objawiający się całkowitym brakiem obecności łysek. Kombinacja ekstraktu z jeżówki z fagiem T4 nie wpłynęła znacząco na zdolność fagów do łysekowania. Dodatek ekstraktu z ruty do lizatu faga phi6 spowodował istotne działanie fagobójcze w większości badanych stężeń, z wyjątkiem dwóch najniższych. Gdy ekstrakt był inkubowany z fagiem T4, zaobserwowano znaczny spadek liczby łysek dla trzech badanych stężeń (6,25%, 1,56% i 0,097%), podczas gdy pozostałe stężenia nie wpłynęły na jego liczebność.

Stechiometrie interakcji ujawniły złożone zależności między testowanymi ekstraktami a bakteriofagami w obecności ich gospodarzy bakteryjnych. W większości przypadków najwyższe stężenie ekstraktów (25%) powodowało wyraźny wzrost biomasy bakteryjnej, jednak komórki nie były już aktywne po 24 godzinach inkubacji w środowisku stacjonarnym. Może to świadczyć o zwiększonej proliferacji komórek w początkowej fazie wzrostu i wcześniejszym osiągnięciu fazy stacjonarnej dzięki obecności ekstraktów, niezależnie od dodanej ilości faga. Zaobserwowano również specyficzne interakcje pomiędzy badanymi elementami oraz wytypowano miejsca potencjalnej synergii do dalszych testów (konkretne połączenia czynników wraz z odpowiadającymi im stężeniami), gdzie obserwowano zwiększoną aktywność bakterii w teście z resazuryną przy równoczesnych pomiarach OD wykazujących zmniejszenie biomasy bakteryjnej.

Profile lizy fagowej wytypowanych połączeń, testowane w środowisku dynamicznym (z mieszaniem) ujawniły różnorodny wpływ ekstraktów na aktywność lityczną fagów. Co więcej, kombinacje potencjalnie synergistyczne okazały się posiadać dużo mniejsze działanie addytywne niż w środowisku statycznym. Obserwowano również odbicia wzrostu hodowli bakteryjnych po początkowym efekcie litycznym, lub opóźniony efekt lityczny. Dodatkowo, wysokie stężenia (25%) oraz niektóre wytypowane niższe stężenia badanych ekstraktów powodowały stymulujący wpływ na komórki bakteryjne – w niektórych przypadkach będąc silniej oddziaływującym efektem w stosunku do antybakteryjnego działania fagów, lub bezpośrednio niwelując efekt lityczny fagów (efekt antyfagowy potwierdzony testem koinkubacji). Silny efekt stymulujący bakterie wywoływany przez ekstrakty w niskich stężeniach może wynikać z wzmocnienia pierwotnego efektu stymulującego (obserwowanego w stężeniach wyższych) poprzez zmianę środowiska na dynamiczne, poprzez częstszy kontakt czynnika z komórkami patogenów.

Założenia dotyczące zróżnicowanego działania ekstraktów na komórki bakterii są zgodne z wynikami prac innych autorów. W pracach tych wykazano, że aktywność ekstraktów roślinnych z jeżówki i ruty była różnorodna nawet podczas aplikacji ekstraktów komercyjnych, a różnice występowały najczęściej w kontekście używania różnych rozpuszczalników ekstrakcyjnych do produkcji ekstraktu (Ivanova i in., 2005; Sharma i in., 2008; Stanisavljević i in., 2009; Moghadam i in., 2012; Amabye, 2015; Hashemi Karouei, 2015; Aarland i in., 2017; Azalework i in., 2017; Coelho i in., 2020). Ponadto, inni badacze dowiedli, że badane ekstrakty wykazują działanie przeciwwirusowe (Pleschka i in., 2009; Hudson, 2012; Vimalanathan i in., 2013; Manayi i in., 2015; Ebrahimi i in., 2021), a niektóre ekstrakty roślinne mają zdolność do hamowania zakaźności fagowej i całkowitego zapobiegania lizie bakterii w zależności od stężenia (Jassim i Naji, 2010; Abolhassani, 2010). Znaczenie wykonywania wielu testów w celu zrozumienia tak złożonych interakcji, które mogą zmieniać się w różnych środowiskach, zostało zauważone także w badaniach Tayyarcan i in. (2019).

W celu potwierdzenia założeń wpływu rodzaju ekstraktu na uzyskiwane wyniki, w kolejnych badaniach wykorzystano ekstrakty metanolowe i acetonowe pozyskane ze stewii. Wyniki tych badań zostały opisane w kolejnej pracy, pt: „The use of plant extracts and bacteriophages as an alternative therapy approach in combating bacterial infections: the study of

lytic phages and *Stevia rebaudiana*". Praca ta została wysłana do Journal of Veterinary Research i jest obecnie recenzowana (**nieopublikowana praca B-1**).

6. Wnioski

Przestawiony powyżej cykl publikacji, stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora, podejmuje temat wpływu wybranych czynników przeciwdrobnoustrojowych na aktywność lityczną bakteriofagów, w kontekście wykrywania ich interakcji o różnym charakterze, w celu określenia potencjalnych możliwości ich jednoczesnej aplikacji w ramach alternatywnego podejścia do zwalczania infekcji bakteryjnych. Na podstawie uzyskanych wyników, sformułowano następujące wnioski:

1. Odpowiednio zmodyfikowana metoda podwójnej warstwy agaru (DLA) poprawia obserwację efektu synergii (PAS) wywołanego przez wybrane antybiotyki aplikowane jednocześnie z litycznym fagiem typu T4.
2. Wybór wariantu modyfikacji metody DLA jest zależny od rodzaju użytego antybiotyku w odniesieniu do konkretnego bakteriofaga i gospodarza bakteryjnego.
3. W celu wizualizacji efektu PAS najefektywniejszą metodą jest standardowa metoda DLA z aplikacją krążków antybiotykowych na agarze górnym, natomiast w celu uzyskania największej ilości zróżnicowanych morfologicznie łysek, najefektywniejszym wariantem jest aplikacja antybiotyku bezpośrednio do agaru dolnego, w obecności agaru górnego.
4. Obecność ujemnego lub dodatniego ładunku nanocząstek nie jest wystarczająca aby bakteriofag przyłączał się do nich w sposób specyficzny, co w konsekwencji może wpłynąć na jego aktywność.
5. Największy wpływ na interakcje fag-nanocząstka ma wartość potencjału zeta nanocząstki: nanomateriały o ZP niższym niż 35 [mV] skutecznie wiążą się elektrostatycznie z dodatnio naładowanymi ogonkami faga, natomiast cząsteczki o ZP wyższym niż 35 [mV] skutecznie wiążą się z ujemnie naładowanymi główkami faga; gdy nanocząstki nie spełniają tych wymagań, fizyczne oddziaływanie fag-nanocząstka staje się niespecyficzne.
6. Elektrostatyczne wiązanie się ogonków bakteriofagów z nanocząstkami o ujemnym ZP (ZP < -35 mV), powodujące ograniczoną aktywność faga, jest procesem odwracalnym.
7. Charakter oddziaływań między fagami a nanocząstkami można przewidywać na podstawie ładunków cząstek wyrażonych w wartościach ZP.
8. Interakcje ekstraktów roślinnych i fagów obserwowane w środowisku statycznym różnią się od tych w środowisku dynamicznym, co wskazuje na znaczenie wykonywania wielu nowoczesnych analiz podczas badań tak złożonych układów.
9. Ekstrakty roślinne z jeżówki purpurowej i ruty aplikowane z litycznymi fagami MS2, T4 i phi6 wykazują wobec siebie działanie antagonistyczne, powodując zależny od stężenia, stymulujący wpływ na komórki bakteryjne.
10. Efekty interakcji fagów i określonych ekstraktów roślinnych mogą wynikać ze wzmocnienia pierwotnego efektu stymulującego poprzez zmianę środowiska ze statycznego na dynamiczne, poprzez częstszy kontakt tych czynników z komórkami eksponowanych bakterii.

Wybrane czynniki przeciwdrobnoustrojowe mają wpływ na aktywność lityczną bakteriofagów. Podczas analiz mieszanin tych czynników i fagów obserwowano interakcje o charakterze synergistycznym, antagonistycznym oraz brak znaczących interakcji. Mieszaniny

wykazujące efekt synergistyczny mają potencjał do ich jednoczesnej aplikacji np. w terapiach łączonych, w ramach alternatywnego podejścia do zwalczania infekcji bakteryjnych. Przeprowadzone badania mogą przyczynić się do opracowania alternatywnych preparatów i/lub metod znajdujących zastosowanie m.in. w profilaktyce i terapii bakteryjnych chorób zwierząt.

7. Piśmiennictwo

1. Sulakvelidze, A.; Alavidze, Z.; Morris, J.G. Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45, 649–659. <https://doi.org/10.1128/aac.45.3.649-659.20>
2. Abedon, S.T.; García, P.; Mullany, P.; Aminov, R. Editorial: Phage Therapy: Past, Present and Future. *Front. Microbiol.* 2017, 8, 981. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00981>
3. Chan, B.K.; Abedon, S.T.; Loc-Carrillo, C. Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiol.* 2013, 8, 769–783. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.47>
4. Hatfull, G.F. Bacteriophage genomics. *Curr. Opin. Microbiol.* 2008, 5, 447–453. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.004>
5. Hendrix, R.W.; Hatfull, G.F.; Smith, M.C. Bacteriophages with tails: Chasing their origins and evolution. *Res. Microbiol.* 2003, 154, 253–257. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00068-8](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00068-8)
6. Ribeiro, J.M.; Pereira, G.N.; Kobayashi, R.K.; Nakazato, G. Antiphage activity of natural and synthetic substances: A new age for antivirals? *Future Microbiol.* 2020, 15, 767–777. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0320>
7. Fedorenko, A.; Grinberg, M.; Orevi, T.; Kashtan, N. Survival of the enveloped bacteriophage Phi6 (a surrogate for SARS-CoV-2) in evaporated saliva microdroplets deposited on glass surfaces. *Sci. Rep.* 2020, 10, 22419. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79625-z>
8. Torres-Barceló, C.; Hochberg, M.E. Evolutionary rationale for phages as complements of antibiotics. *Trends Microbiol.* 2016, 24, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.12.011>
9. Zhang, Q.-G.; Buckling, A. Phages limit the evolution of bacterial antibiotic resistance in experimental microcosms. *Evol. App.* 2012, 5, 575–582. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2011.00236.x>
10. Comeau, A.M.; Tétart, F.; Trojet, S.N.; Prere, M.F.; Krisch, H.M. Phage-antibiotic synergy (PAS): β -lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. *PLoS ONE* 2007, 2, e799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000799>
11. Stark, W.J. Nanoparticles in biological systems. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 1242–1258. <https://doi.org/10.1002/anie.200906684>
12. Salata, O.C. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J. Nanobiotechnology* 2004, 2, 3. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-2-3>
13. Khan, I.; Saeed, K.; Khan, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab. J. Chem.* 2019, 12, 908–931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
14. Hajipour, M.J.; Fromm, K.M.; Ashkarran, A.A.; de Aberasturi, D.J.; de Larramendi, I.R.; Rojo, T.; Serpooshan, V.; Parak, W.J.; Mahmoudi, M. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol.* 2012, 30, 499–511. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.06.004>
15. Moritz, M.; Geszke-Moritz, M. The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. *Chem. Eng. J.* 2013, 228, 596–613. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.05.046>
16. Paczesny, J.; Bielec, K. Application of bacteriophages in nanotechnology. *Nanomaterials* 2020, 10, 1944. <https://doi.org/10.3390/nano10101944>
17. Ghosh, A.; Das, B.K.; Roy, A.; Mandal, B.; Chandra, G. Antibacterial activity of some medicinal plant extracts. *J. Nat. Med.* 62, 259–262 (2008). <https://doi.org/10.1007/s11418-007-0216-x>
18. Nascimento, G.G.; Locatelli, J.; Freitas, P.C.; Silva, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz. J. Microbiol.* 2000, 31, 247–256. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822000000400003>
19. Efenberger-Szmechtyk, M.; Nowak, A.; Czyzowska, A. Plant extracts rich in polyphenols: antibacterial agents and natural preservatives for meat and meat products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2021, 61(1), 149–178. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1722060>
20. Kropinski, A.M.; Mazzocco, A.; Waddell, T.E.; Lingohr, E.; Johnson, R.P. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. W: *Bacteriophages. Methods in Molecular*

- Biology*; Clokie, M.R., Kropinski, A.M., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2009; Volume 501, pp. 69–76.
21. Wiegand, I.; Hilpert, K.; Hancock, R.E.W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* 2008, 3, 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
 22. Gu Liu, C.; Green, S.I.; Min, L.; Clark, J.R.; Salazar, K.C.; Terwilliger, A.L.; Kaplan, H.B.; Trautner, B.W.; Ramig, R.F.; Maresso, A.W. Phage-antibiotic synergy is driven by a unique combination of antibacterial mechanism of action and stoichiometry. *MBio* 2020, 11, e01462-20. <https://doi.org/10.1128/mbio.01462-20>
 23. Ryan, E.M.; Alkawareek, M.Y.; Donnelly, R.F.; Gilmore, B.F. Synergistic phage-antibiotic combinations for the control of *Escherichia coli* biofilms in vitro. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2012, 65, 395–398. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00977.x>
 24. Payne, O.B.; Ericson, J.E. Chapter 2 — Empiric Antimicrobials for Neonatal Sepsis. W: *Infectious Disease and Pharmacology*; Benitz, W.E., Smith, P.B., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 15–25.
 25. Cademartiri, R.; Anany, H.; Gross, I.; Bhayania, R.; Griffiths, M.; Brook, M.A. Immobilization of bacteriophages on modified silica particles. *Biomaterials* 2010, 31, 1904–1910. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.029>
 26. Richter, L.; Paszkowska, K.; Cendrowska, U.; Olgiati, F.; Silva, P.J.; Gasbarri, M.; Guven, Z.P.; Paczesny, J.; Stellacci, F. Broad spectrum nanoparticles against bacteriophage infections. *Nanoscale* 2021, 13, 18684–18694. <https://doi.org/10.1039/D1NR04936D>
 27. Ivanova, A.; Mikhova, B.; Najdenski, H.; Tsvetkova, I.; Kostova, I. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Ruta graveolens*. *Fitoterapia* 2005, 76, 344–347. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.02.008>
 28. Sharma, M.; Vohra, S.; Arnason, J.T.; Hudson, J.B. Echinacea extracts contain significant and selective activities against human pathogenic bacteria. *Pharm. Biol.* 2008, 46, 111–116. <https://doi.org/10.1080/13880200701734919>
 29. Stanisavljević, I.; Stojičević, S.; Veličković, D.; Veljković, V.; Lazić, M. Antioxidant and antimicrobial activities of *Echinacea (Echinacea purpurea L.)* extracts obtained by classical and ultrasound extraction. *Chin. J. Chem. Eng.* 2009, 17, 478–483. [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(08\)60234-7](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(08)60234-7)
 30. Moghadam, M.A.J.; Honarmand, H.; Falah-Delavar, S.; Saeidinia, A. Study on antibacterial effect of *Ruta graveolens* extracts on pathogenic bacteria. *Ann. Biol. Res.* 2012, 3, 4542–4545.
 31. Amabye, T.G. Phytochemical screening and evaluation of antibacterial activity of *Ruta graveolens L.* - a medicinal plant grown around Mekelle, Tigray, Ethiopia. *Nat. Prod. Chem. Res.* 2015, 3, 1000195. <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000195>
 32. Hashemi Karouei, S.M. Antifungal and antibacterial effects of *Ruta graveolens* extracts. *Int. J. Mol. Clin. Microbiol.* 2015, 5, 475–480.
 33. Aarland, R.C.; Bañuelos-Hernández, A.E.; Fragosó-Serrano, M.; Sierra-Palacios, E.D.C.; Díaz de León-Sánchez, F.; Pérez-Flores, L.J.; Rivera-Cabrera, F.; Mendoza-Espinoza, J.A. Studies on phytochemical, antioxidant, anti-inflammatory, hypoglycaemic and antiproliferative activities of *Echinacea purpurea* and *Echinacea angustifolia* extracts. *Pharm. Biol.* 2017, 55, 649–656. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1265989>
 34. Azalework, H.G.; Sahabjada, A.J.; Arshad, T.M. Phytochemical investigation, GC-MS profile and antimicrobial activity of a medicinal plant *Ruta graveolens L.* from Ethiopia. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2017, 9, 29–34. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i6.16812>
 35. Coelho, J.; Barros, L.; Dias, M.I.; Finimundy, T.C.; Amaral, J.S.; Alves, M.J.; Calhelha, R.C.; Santos, P.F.; Ferreira, I.C.F.R. *Echinacea purpurea (L.) Moench*: Chemical characterization and bioactivity of its extracts and fractions. *Pharmaceuticals* 2020, 13, 125. <https://doi.org/10.3390/ph13060125>
 36. Pleschka, S.; Stein, M.; Schoop, R.; Hudson, J.B. Anti-viral properties and mode of action of standardized *Echinacea purpurea* extract against highly pathogenic avian influenza virus (H5N1, H7N7) and swine-origin H1N1 (S-OIV). *Virol. J.* 2009, 6, 197. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-197>
 37. Hudson, J.B. Applications of the phytomedicine *Echinacea purpurea* (Purple Coneflower) in infectious diseases. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 2012, 769896. <https://doi.org/10.1155/2012/769896>
 38. Vimalanathan, S.; Schoop, R.; Hudson, J. High-potency anti-influenza therapy by a combination of *Echinacea purpurea* fresh herb and root tinctures. *J. App. Pharm. Sci.* 2013, 3, 1–5.
 39. Manayi, A.; Vazirian, M.; Saeidnia, S. *Echinacea purpurea*: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods. *Pharmacogn. Rev.* 2015, 9, 63. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.156353>

40. Ebrahimi, E.; Mousavi-Jazayeri, S.M.; Rezaee, M.B.; Parsania, M. Antiviral effects of *Aloe vera* (L.) Burm. f. and *Ruta graveolens* L. extract on acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1. *J. Med. Plants By-Prod.* 2021, 10, 103–108. <https://doi.org/10.22092/jmpb.2021.352463.1286>
41. Jassim, S.A.; Naji, M.A. In vitro evaluation of the antiviral activity of an extract of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) pits on a *Pseudomonas* phage. *eCAM* 2010, 7, 57–62. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem160>
42. Abolhassani, M. Antiviral activity of borage (*Echium amoenum*). *Arch. Med. Sci.* 2010, 6, 366–369. <https://doi.org/10.5114/aoms.2010.14256>
43. Tayyarcı, E.K.; Acar Soykut, E.; Menteş, Yılmaz, O.; Boyacı, I.H.; Khaaladi, M.; Fattouch, S. Investigation of different interactions between *Staphylococcus aureus* phages and pomegranate peel, grape seed, and black cumin extracts. *J. Food Saf.* 2019, 39, e12679. <https://doi.org/10.1111/jfs.12679>

8. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Działalność naukową rozpoczęłam już w 2016 roku w Katedrze Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej (obecnie Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii) na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, prowadząc badania w ramach pracy dyplomowej realizowanej podczas studiów inżynierskich pt.: „Ocena aktywności antybakteryjnej i antygrzybiczej olejku eterycznego pozyskanego z macierzanki piaskowej (*Thymus serpyllum* L.)”. Praca została wykonana pod kierunkiem dr hab. inż. Pawła Nawrotka, prof. ZUT, a następnie przygotowana do opublikowania. Publikacja ukazała się w 2019 roku (A-1). Wtedy też zainteresowałam się tematyką czynników przeciwdrobnoustrojowych, zaangażowałam się w badania naukowe prowadzone w Katedrze, wstąpiłam do Studenckiego Koła Naukowego Mikrobiologów nawiązując pierwsze współprace badawcze.

Rozwój naukowy kontynuowałam w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii, prowadząc badania w ramach pracy dyplomowej realizowanej podczas studiów magisterskich pt.: „Ocena potencjału aplikacyjnego bakteriofagów środowiskowych, zaadsorbowanych do powierzchni podkładów absorpcyjnych, wykazujących aktywność bakteriolityczną wobec wybranych bakteryjnych patogenów żywności”. Praca została również wykonana pod kierunkiem dr hab. inż. Pawła Nawrotka, prof. ZUT i zaowocowała zainteresowaniem bakteriofagami litycznymi. Po obronie pracy magisterskiej, z dniem 1 października 2017 r., rozpoczęłam naukę na studiach doktoranckich. Z uwagi na doskonałe zaplecze naukowo-badawcze oraz interesującą mnie tematykę badawczą Katedry, badania w ramach pracy doktorskiej realizowałam również w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie pod kierunkiem dr hab. inż. Pawła Nawrotka, prof. ZUT, których efektem jest niniejsza rozprawa doktorska składająca się z cyklu trzech powiązanych tematycznie publikacji naukowych.

W trakcie mojej działalności badawczej zgromadziłam dorobek naukowy, na który składa się 14 publikacji, 2 patenty, 1 zgłoszenie patentowe oraz 3 rozdziały w monografiach naukowych. Byłam również wykonawcą w 4 projektach naukowych, w tym w granicie PRELUDIUM finansowanym ze źródeł Narodowego Centrum Nauki pt. „Wpływ nanomateriałów fotoaktywnych na stabilność mikrobiologiczną i skład chemiczny soku winogronowego i wina”, 2 grantów badawczo-rozwojowych realizowanych w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Zachodniopomorskiego pt. „Opracowanie powłok i granulatów tworzyw sztucznych o przedłużonym działaniu

antywirusowym do produkcji materiałów i elementów urządzeń” i „Opracowanie powłok i granulatów tworzyw sztucznych o przedłużonym działaniu antywirusowym i antibakteryjnym” oraz 1 projekcie współfinansowanym ze środków Unii Europejskiej w ramach działania M16 „WSPÓŁPRACA” Programu Rozwoju Obszarów Wiejskich pt. „Wino bez siarki: innowacyjne technologie w winnicy i winiarni wspierające ograniczenie dodatku siarki do win gronowych”. Podczas studiów doktoranckich odbyłam 4 staże krajowe – w Ogrodzie Dendrologicznym w Przelewicach, w Katedrze Genetyki Molekularnej Bakterii na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, w firmie PhageArmour Sp. z o.o. oraz w Katedrze Fizykochemii Nanomateriałów na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Brałam także czynny udział w wielu konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym. W celu podniesienia swoich kwalifikacji odbyłam także 6 certyfikowanych szkoleń, w tym szkoleń z obsługi specjalistycznego sprzętu. Jestem również aktywnym członkiem Studenckiego Koła Naukowego Mikrobiologów działającego w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii ZUT oraz członkiem Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Zostałam także laureatką Stypendium Naukowego Prezydenta Miasta Szczecin dla najzdolniejszych studentów i doktorantów – stypendystka 2021 roku. W ramach promocji Katedry, Wydziału i macierzystej uczelni wielokrotnie brałam też udział w prowadzeniu warsztatów naukowych.

[A-1] **Stachurska, X.** (2019) Bactericidal and fungicidal activity of the wild thyme (*Thymus serpyllum*) essential oil. *Folia Pomer. Univ. Technol. Stetin. Agric., Aliment., Pisc., Zootech.*, 350(51)3, 33–44. DOI: 10.21005/AAPZ2019.51.3.04

10 pkt. MEiN

8.1. Osiągnięcia naukowe związane z badaniami z wykorzystaniem bakteriofagów litycznych

Od początku swojej działalności naukowej w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii byłam zaangażowana w badania nad bakteriofagami. Będąc członkiem fagowej grupy badawczej, w pierwszej kolejności doskonaliłam swój warsztat dotyczący izolacji litycznych fagów środowiskowych oraz różnych metod ich charakteryzacji wraz z określaniem potencjału aplikacyjnego. Wynikiem prowadzonych prac było uczestnictwo w wielu konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym, gdzie prezentowałam wyniki swoich badań. Potencjał aplikacyjny fagów litycznych interesował mnie przede wszystkim w kontekście stosowania bakteriofagów jako alternatyw dla komercyjnie stosowanych antybiotyków, w szczególności w obszarze zdrowia i dobrostanu zwierząt. Wynikiem tych zainteresowań był udział w badaniach, których wyniki wykazały, że wyizolowany lityczny bakteriofag ECPS-6 charakteryzował się wysoką stabilnością (w 70°C przez 20 min oraz w szerokim zakresie pH: 3,0 – 11,0) oraz skutecznie infekował komórki *E. coli* O157:H7. W wyniku badania aktywności faga w mleku surowym zanieczyszczonym tym patogenem wykazano istotną redukcję komórek bakteryjnych. Udowodniono, że bakteriofag ECPS-6 ma potencjał, aby być stosowanym w przetwórstwie mleczarskim, ze względu na jego wszechstronne cechy, takie jak stabilność termiczna i chemiczna (A-2).

Podczas badań nad aplikacyjnym zastosowaniem bakteriofagów litycznych, brałam także udział w eksperymentach, których wynikiem jest patent zakładający wykorzystanie fagów

jako część składową biosensora kolorymetrycznego do detekcji bakterii z gatunku *Escherichia coli* (P-1).

Podczas rozwijania zainteresowań badawczych w obszarze stosowania bakteriofagów w kontekście zdrowia i dobrostanu zwierząt, brałam także udział w badaniach, których wynikiem jest patent opisujący preparat fagowy do zwalczania zakażeń u świń wywołanych przez patogen *Streptococcus suis* (P-2) oraz zgłoszenie patentowe opisujące preparat fagowy do zwalczania zakażeń u psów i kotów wywołanych przez patogen *Streptococcus canis* (P-3).

[A-2] Grygorcewicz, B., Chajęcka-Wierzchowska, W., Augustyniak, A., Wasak, A., **Stachurska, X.**, Nawrotek, P., Dołęgowska, B. (2019) In-milk inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by the environmental lytic bacteriophage ECPS-6. *J. Food. Saf.*, 40(2), e12747. DOI: 10.1111/jfs.12747

IF₂₀₁₉ – 1,133; 20 pkt. MEiN

[P-1] B. Grygorcewicz, A. Wasak, A. Augustyniak, **X. Stachurska**, R. Drozd, P. Nawrotek. Sposób wytwarzania biosensora kolorymetrycznego do detekcji bakterii z gatunku *Escherichia coli* i biosensor kolorymetryczny do detekcji bakterii z gatunku *Escherichia coli*. Numer zgłoszenia: P. 423812, numer prawa wyłącznego: Pat.236550, 2020.

[P-2] B. Grygorcewicz, A. Augustyniak, **X. Stachurska**. Preparat do zwalczania zakażeń *Streptococcus suis*. Numer zgłoszenia: P.426570, numer prawa wyłącznego: Pat.237005, 2020.

[P-3] B. Grygorcewicz, **X. Stachurska**. Preparat fagowy przeciwko *Streptococcus canis* i sposób podania. Numer zgłoszenia: P.425418.

8.2. Osiągnięcia naukowe związane z badaniami z wykorzystaniem czynników przeciwdrobnoustrojowych

Problematyką szeroko pojętych czynników przeciwdrobnoustrojowych zainteresowałam się już przy prowadzeniu badań do pracy inżynierskiej. Temat ten zdecydowałam się więc połączyć w swojej dysertacji doktorskiej z zagadnieniem bakteriofagów litycznych. Podczas studiów doktoranckich zaangażowałam się więc we współpracę naukowe, których przedmiotem były między innymi czynniki, które miałam zamiar także użyć w badaniach własnych. Wzięłam więc udział w projekcie badawczym, realizowanym w ramach grantu PRELUDIUM finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki pt. „Wpływ nanomateriałów fotoaktywnych na stabilność mikrobiologiczną i skład chemiczny soku winogronowego i wina”, realizowanego we współpracy z Katedrą Fizykochemii Nanomateriałów, ZUT jako wykonawca. W ramach przeprowadzanych badań, powstała publikacja naukowa, opisująca wpływ nanosfer krzemionkowych na komórki bakterii winiarskich *Oenococcus oeni* odpowiedzialnych za fermentację jabłkowo-mlekową podczas produkcji wina (A-3). W badaniach wykazano, antibakteryjny wpływ nanosfer aplikowanych w stężeniu 0,5 mg/mL, w środowisku dynamicznym (mieszanie ciągłe) a wyniki te potwierdzono podczas obrazowania transmisyjnego TEM i skaningowego SEM, uwidaczniając rozległe uszkodzenia komórek powstałe w wyniku kontaktu fizycznego spowodowanego przez nanosfery krzemionkowe (A-3). Obiecujące wyniki powstające z uczestnictwa w projekcie PRELUDIUM zainspirowały mnie do zaangażowania się w kolejny projekt o podobnej tematyce jako wykonawca: „Wino

bez siarki: innowacyjne technologie w winnicy i winiarni wspierające ograniczenie dodatku siarki do win gronowych” realizowany w ramach działania M16 „WSPÓŁPRACA” Programu Rozwoju Obszarów Wiejskich, we współpracy z Katedrą Ogrodnictwa, ZUT. Wyniki powstałe przy udziale w projekcie znajdują się obecnie w opracowaniu.

Z uwagi na interesujące wyniki powstające z udziału w wyżej wymienionym projekcie, zdecydowałam się na uczestnictwo w publikacji, będącej przeglądem literatury na temat potencjału zastosowania bakteriofagów i nanomateriałów do zwalczania chorób bakteryjnych u zwierząt (A-4), co w znacznym stopniu przyczyniło się do ukierunkowania moich założeń badawczych w niniejszej dysertacji.

Ze względu na pandemię wynikającą z globalnego rozprzestrzenienia się wirusa SARS-CoV-2 nastąpił znaczny wzrost zapotrzebowania na alternatywne metody sanityzacji powierzchni, które ograniczyłyby rozprzestrzenianie się wirusa. W odpowiedzi na te potrzeby nawiązałam współpracę naukową z Centrum Bioimmobilizacji i Innowacyjnych Materiałów Opakowaniowych ZUT, pod kątem opracowania nowatorskich materiałów o aktywności przeciwwirusowej. Prowadzone badania były częścią 2 grantów badawczo-rozwojowych realizowanych w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Zachodniopomorskiego pt. „Opracowanie powłok i granulatów tworzyw sztucznych o przedłużonym działaniu antywirusowym do produkcji materiałów i elementów urządzeń” oraz „Opracowanie powłok i granulatów tworzyw sztucznych o przedłużonym działaniu antywirusowym i antybakteryjnym”. Zachowując wspomniany trend badawczy, zaangażowałam się w przeprowadzanie analiz przeciwwirusowych, opracowywanych innowacyjnych materiałów opakowaniowych, w formie filmów polietylenowych z dodatkiem różnych ekstraktów roślinnych o działaniu przeciwdrobnoustrojowym (A-5, A-6, A-7, A-8). W tym celu, zastosowałam bakteriofagi lityczne (MS2, T1, T4, phiX174 oraz phi6) występujące jako modelowe surogaty dla wirusa SARS-CoV-2. Dzięki temu podejściu badawczemu, wytworzono i scharakteryzowano innowacyjne materiały opakowaniowe o aktywności antybakteryjnej i przeciwwirusowej. Udział w badaniach prowadzonych we współpracy z Centrum Bioimmobilizacji i Innowacyjnych Materiałów Opakowaniowych ZUT pozwolił mi na ukierunkowanie własnego podejścia badawczego oraz wybór bakteriofagów i ekstraktów roślinnych użytych w analizach będących częścią niniejszej dysertacji.

[A-3] Pachnowska, K., Cendrowski, K., **Stachurska, X.**, Nawrotek, P., Augustyniak, A., Mijowska, E. (2020) Potential use of silica nanoparticles for the microbial stabilisation of wine: an *in vitro* study using *Oenococcus oeni* as a model. *Foods*, 9, 1338. DOI: 10.3390/foods9091338

IF₂₀₂₀ – 4,350; 70 pkt. MEiN

[A-4] Nawrotek, P., **Stachurska, X.**, Augustyniak, A. (2020) Potential of using bacteriophages and nanomaterials for eradicating bacterial diseases in animals. *Med. Weter.*, 76(07), 6382-2020. DOI: 10.21521/mw.6382

IF₂₀₂₀ – 0,383; 20 pkt. MEiN

[A-5] Mizielńska, M., Nawrotek, P., **Stachurska, X.**, Ordon, M., Bartkowiak, A. (2021) Packaging covered with antiviral and antibacterial coatings based on ZnO nanoparticles supplemented with geraniol and carvacrol. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 1717. DOI: 10.3390/ijms22041717

IF₂₀₂₁ – 6,208; 140 pkt. MEiN

[A-6] Ordon, M., Nawrotek, P., **Stachurska, X.**, Mizielińska, M. (2021) Polyethylene films coated with antibacterial and antiviral layers based on CO₂ extracts of raspberry seeds, of pomegranate seeds and of rosemary. *Coatings*, 11, 1179. DOI: 10.3390/coatings11101179

IF₂₀₂₁ – 3,236; 100 pkt. MEiN

[A-7] Ordon, M., Nawrotek, P., **Stachurska, X.**, Schmidt, A., Mizielińska, M. (2021) Mixtures of *Scutellaria baicalensis* and *Glycyrrhiza* L. extracts as antibacterial and antiviral agents in active coatings. *Coatings*, 11, 1438. DOI: 10.3390/coatings11121438

IF₂₀₂₁ – 3,236; 100 pkt. MEiN

[A-8] Ordon, M., Zdanowicz, M., Nawrotek, P., **Stachurska, X.**, Mizielińska, M. (2021) Polyethylene films containing plant extracts in the polymer matrix as antibacterial and antiviral materials. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 13438. DOI: 10.3390/ijms222413438

IF₂₀₂₁ – 6,208; 140 pkt. MEiN

8.3. Osiągnięcia naukowe związane działalnością badawczą Katedry Mikrobiologii i Biotechnologii

Podczas studiów doktoranckich byłam również aktywnym członkiem Studenckiego Koła Naukowego Mikrobiologów, angażując się w tematy i działania badawcze z zakresu zainteresowań Koła. Jednym z nich było określanie charakterystyki i użyteczności mikroorganizmów środowiskowych, których wynikiem była między innymi publikacja opisująca tolerancję bakterii izolowanych ze środowiska na metale ciężkie (**A-9**). Celem pracy była izolacja mikroorganizmów o potencjale bioremediacyjnym z gleby zanieczyszczonej związkami metali ciężkich oraz analiza tolerancji tych mikroorganizmów na różne stężenia metali ciężkich. W badaniach wykazano, że wrażliwość wyizolowanych mikroorganizmów na metale ciężkie okazała się zależna od rodzaju użytego podłoża. Zastosowanie płynnych pożywek podczas testów toksyczności spowodowało obniżoną tolerancję izolatów na metale ciężkie w stosunku do hodowli na podłożach stałych. Dzięki temu wykazano, że wyizolowane szczepy mają potencjał bioremediacyjny przy aplikacji do środowisk stałych, podlegających powolniejszym zmianom, np. aplikacja do gleby zamiast aplikacji do ekosystemów wodnych (**A-9**).

Ze względu na obiecujące wyniki, temat potencjału bioremediacyjnego szczepów środowiskowych był kontynuowany. Tym razem, zespół badawczy którego byłam częścią skupił się na problematyce skażenia gleby wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi (WWA). Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracy zespołowej, której głównymi celami było wyizolowanie bakterii z gleby chronicznie skażonej WWA, stworzenie autochtonicznego konsorcjum mikrobiologicznego i ocena jego zdolności do degradacji WWA w rodzimej zanieczyszczonej glebie (**A-10**). W niniejszej pracy przeprowadzono wieloetapowy proces izolacji bakterii, w którym wyselekcjonowano szczepy o najlepszym potencjale bioremediacyjnym, posiadające geny odpowiedzialne za degradację WWA (*pahE*). Szczepy przebadano także pod kątem ich tolerancji na metale ciężkie, interakcji antagonistycznych, fitotoksyczności oraz wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe. W badaniach wykazano obniżenie całkowitej zawartości WWA o 93,5% po pierwszym dniu inkubacji i o 99,22% po ósmym dniu inkubacji *in vitro*. Eksperyment bioremediacyjny przeprowadzony *in situ* na skażonym terenie wykazał średnie obniżenie całkowitego stężenia WWA o 33,3% po 5 miesiącach i o ponad 72% po 13 miesiącach od aplikacji w porównaniu ze stężeniem zarejestrowanym przed interwencją, przez co udowodniono, że autochtoniczne konsorcjum

mikrobiologiczne wyizolowane z gleby zanieczyszczonej WWA może potencjalnie usprawnić proces bioremediacji w znacznym stopniu (A-10).

Będąc członkiem koła zainteresowałam się również problematyką bezpieczeństwa mikrobiologicznego gotowych karm dla zwierząt towarzyszących, z uwagi na problem braku norm Komisji Europejskiej dotyczących dopuszczalnych ilości mikroorganizmów w karmach dla zwierząt domowych. Dlatego też zaangażowałam się w badania oceny wartości odżywczej i bezpieczeństwa mikrobiologicznego komercyjnie dostępnych karm dla psów (A-11). Do analiz wykorzystano 36 suchych karm dla psów. Całkowita liczba drobnoustrojów tlenowych w analizowanych karmach wahała się od $2,7 \times 10^2$ do ponad $3,0 \times 10^7$ CFU/g. W pięciu (14%) karmach wykryto obecność gronkowców, jednak nie stwierdzono koagulazo-dodatniego *Staphylococcus* (CPS). Obecność pleśni stwierdzono w jednej bezzbożowej karmie dla psów i w sześciu karmach zbożowych. W żadnej z analizowanych próbek nie stwierdzono obecności *Enterobacteriaceae*. Nie wykryto również bakterii z rodzaju *Listeria* i *Clostridium* oraz drożdży. Podsumowując, wykazano, że badane suche karmy dla psów charakteryzowały się zróżnicowaną jakością mikrobiologiczną a wykryta liczba mikroorganizmów może mieć pewne implikacje zdrowotne dla długotrwałego spożycia skażonej żywności przez zwierzęta (A-11).

[A-9] **Stachurska, X.**, Środa, B., Dubrowska, K., Jabłońska, J., Roszak, M., Karakulska J. (2020) Tolerance of environmental bacteria to heavy metals. *Acta Sci. Pol. Zootech.*, 19(2), 63-74. DOI: 10.21005/asp.2020.19.2.08

20 pkt. MEiN

[A-10] Roszak, M., Jabłońska, J., **Stachurska, X.**, Dubrowska, K., Kajdanowicz, J., Gołębiowska, M., Kiepas-Kokot, A., Osińska, B., Augustyniak, A., Karakulska, J. (2021) Development of an autochthonous microbial consortium for enhanced bioremediation of PAH-contaminated soil. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 13469. DOI: 10.3390/ijms222413469

IF₂₀₂₁ – 6,208; 140 pkt. MEiN

[A-11] Kazimierska, K., Biel, W., Witkowicz, R., Karakulska, J., **Stachurska, X.** (2021) Evaluation of nutritional value and microbiological safety in commercial dog food. *Vet. Res. Commun.*, 45, 111–128. DOI: 10.1007/s11259-021-09791-6

IF₂₀₂₁ – 2,816; 100 pkt. MEiN

Załącznik 1

Kopie publikacji naukowych wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską

Xymena Stachurska

Rozprawa doktorska

**WPŁYW WYBRANYCH CZYNNIKÓW PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH NA
AKTYWNOŚĆ BAKTERIOLITYCZNAĄ BAKTERIOFAGÓW**



Article

Double-Layer Agar (DLA) Modifications for the First Step of the Phage-Antibiotic Synergy (PAS) Identification

Xymena Stachurska ^{1,*} , Marta Roszak ², Joanna Jabłońska ³ , Małgorzata Mizielnińska ⁴
and Paweł Nawrotek ¹

- ¹ Nanotechnology Center for Education and Research, Department of Microbiology and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Animal Husbandry, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Piastów Avenue 45, 70-311 Szczecin, Poland; pawel.nawrotek@zut.edu.pl
- ² Department of Laboratory Medicine, Chair of Microbiology, Immunology, and Laboratory Medicine, Pomeranian Medical University in Szczecin, Powstańców Wielkopolskich Avenue 72, 70-111 Szczecin, Poland; marta.roszak@pum.edu.pl
- ³ Department of Chemical Engineering, Faculty of Chemical Technology and Engineering, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Piastów Avenue 42, 71-065 Szczecin, Poland; joanna_jablonska@zut.edu.pl
- ⁴ Center of Bioimmobilisation and Innovative Packaging Materials, Faculty of Food Sciences and Fisheries, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Janickiego 35, 71-270 Szczecin, Poland; malgorzata.mizielinska@zut.edu.pl
- * Correspondence: xymena.stachurska@zut.edu.pl



Citation: Stachurska, X.; Roszak, M.; Jabłońska, J.; Mizielnińska, M.; Nawrotek, P. Double-Layer Agar (DLA) Modifications for the First Step of the Phage-Antibiotic Synergy (PAS) Identification. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1306. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111306>

Academic Editor: Grzegorz Węgrzyn

Received: 29 September 2021

Accepted: 22 October 2021

Published: 26 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The research carried out so far for phage-antibiotic synergy (PAS) differs as regards the technique of modifying the double-layer agar (DLA) method to show the PAS effect on Petri plates, which may contribute to non-uniform research results. Therefore, there is a need to unify the method to effectively detect the PAS effect, at its most basic in vitro test. In this study, bacteriophage T4₅ and 43 antibiotics belonging to different antibiotic classes were used. Seven different DLA method modifications were tested, in terms of antibiotic addition placement and presence or absence of the base agar. The overall number of phage plaques per plate mainly depended on the antibiotic used. Differences in plaque quantity depended on the type of the DLA method modification. The largest total number of plaques was obtained by the addition of an antibiotic to a bottom agar with the presence of a top agar. This indicates that even though an antibiotic could manifest the PAS effect by a standard disk method, it would be worth examining if the effect is equally satisfactory when applying antibiotics directly into the agar, with regards to using the same bacteriophage and bacterial host.

Keywords: antibiotics; bacteriophage; phage-antibiotic synergy; *Escherichia coli*; double-layer agar method

1. Introduction

With the increase in the frequency of antibiotic resistance and the decreasing numbers of new antibiotics being developed [1], alternative strategies for antibiotic therapy are urgently needed by the worldwide medical and scientific community. Bacteriophages have recently gained interest as therapeutic agents [2].

Phage therapy is based on the use of lytic phages to combat bacterial infections, including multidrug-resistant bacteria, and has many advantages, as phages persist as long as the targeted bacteria are present. Moreover, phages are very specific and efficient for their bacterial host. This reduces the destruction of natural flora and presents no detrimental effects on human cells [3]. Therefore, some researchers have become interested in using phages in combination with modern antibiotics and have demonstrated that an approach of using phages, along with the antibiotics can be a promising way to improve antimicrobial activity [4–9].

This phenomenon is known as phage-antibiotic synergy (PAS), given this name by the authors who first described this effect [10]. The PAS effect occurs when sub-lethal concentrations of certain antibiotics substantially stimulate a host bacterium to produce virulent phage [4,10]. Phages may offer the much-needed potential to complement antibiotics, mostly due to differences in their modes of action but also because of the countless diversity of the phages. The logic of combining phages and antibiotics stems from an evolutionary understanding that two sufficiently different selective pressures are likely to be more effective than either alone [11].

The expected benefit of such a dual approach might be enhanced bacterial suppression, more efficient penetration into biofilms, and a decrease in the emergence of resistance [12]. The last point seems to be the most interesting, since it has been demonstrated that phage selection pressure on multi-drug-resistant (MDR) *P. aeruginosa* produces an evolutionary trade-off, whereby the evolution of bacterial resistance to phage attack changes the efflux pump mechanism, causing increased sensitivity to drugs from several antibiotic classes [13]. Hypothetically, this promising result might also occur in other bacterial pathogens with similar modes of achieving broad antibiotic resistance [14].

Although the lytic activity of phages has been shown to be synergistically enhanced in the presence of antibiotics, PAS is still not fully understood. The research carried out to date differs as regards the method of modifying the double-layer agar (DLA) method to demonstrate the PAS effect [15,16], which may contribute to non-uniform research results at the most important method level. Moreover, DLA phage assay methodology can direct the choice of phage-antibiotic combinations for further testing of this phenomenon. Therefore, there is a need to unify a method of effectively detecting the PAS effect in a first, most basic in vitro test on Petri plates.

The purpose of the study was to standardize the double-layer agar (DLA) method on Petri plates for T4-like phages, in order to evaluate the most efficient variable for phage-antibiotic synergy (PAS) effect detection.

2. Results

2.1. Antibiotic Selection to Enable the Occurrence of the PAS Effect

The experiments were performed relying on guidelines and based on the findings of Comeau et al. [10]. The results of the study determined: the high possibility of the occurrence of the PAS effect (++) , by detecting an increased amount of morphologically larger (than standard) T₄₅ plaques, in the bacterial inhibition zones caused by the antibiotic; the possibility of the occurrence of the PAS effect (+), by detecting the appearance of the larger plaques in the sub-lethal zones; (edge of the zones surrounding antibiotic disks where there is a sub-lethal concentration of the drug) no PAS effect (/), when plaques had a standard size of T₄₅ bacteriophage and plaque quantity had not changed; possible antagonist effect (-), when there were less morphologically standard plaques within the sub-lethal drug zones (Figure 1).

The results of this experiment are shown in Table 1. From 43 antibiotics used for PAS effect determination, two β -lactams (cefotaxime and ceftazidime) demonstrated a high possibility that the PAS effect would occur. Also, ampicillin was characterized as provoking PAS induction (data not shown). A total of 14 antibiotics demonstrated the possibility of the occurrence of the PAS effect by the appearance of some larger plaques in the sub-lethal zones. They were as follows: (β -lactams) aztreonam, amoxicillin/clavulanic acid, piperacillin, cefoperazone, piperacillin/tazobactam, ticarcillin, meropenem, cefoxitin, (fluoroquinolones) marbofloxacin, flumequine, ciprofloxacin, (polymyxin antibiotic) colistin sulfate, and (sulfonamide with DHFR inhibitor) trimethoprim-sulfamethoxazole. A possible antagonistic effect was detected with 6 antibiotics: (tetracyclines) tigecycline, tetracycline, doxycycline, (amino-glycosides) streptomycin, kanamycin, and gentamicin. Other antibiotics showed no effect (Table 1).

Cefotaxime and ampicillin were selected for further experimentation.

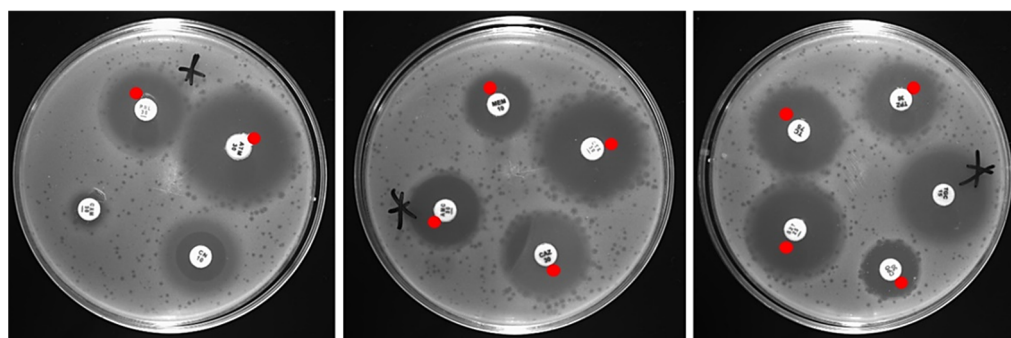


Figure 1. Sample visualization of the occurrence of the PAS effect. Antibiotics classified as demonstrating the potential for the PAS effect (marked with red dots) were characterized as showing larger phage plaques in zones surrounding antibiotic disks where there was a sub-lethal concentration of the drug, compared to the standard T₄₅ plaques. A star asterisk indicates plates where the PAS effect was present.

Table 1. Antibiotics used in the determination of the occurrence of PAS effect: (++) high possibility of PAS effect occurrence, (+) possibility of PAS effect occurrence, (/) no effect, (-) possible antagonist effect.

Antibiotic (Abbreviation and Concentration)	Probability of the PAS Effect Occurrence	Antibiotic (Abbreviation and Concentration)	Probability of the PAS Effect Occurrence	Antibiotic (Abbreviation and Concentration)	Probability of the PAS Effect Occurrence
ATM 30	+	AMC 30	+	UB 30	+
PRL 30	+	CTX 30	++	DA 2	/
CN 10	-	CAZ 30	++	VA 30	/
CXM 30	/	CPD 30	+	CFP 75	+
NOR 10	/	SXT 25	+	CL 30	/
AML 25	/	TGC 15	-	TE 30	-
TOB 10	/	TPZ 36	+	LNZ 30	/
AK 30	/	TC 75	+	FA 10	/
SYN 15	/	MEM 10	+	RA 5	/
AUG 3	/	FOR CYL	+	TEC 30	/
CEF 30	/	DO 30	-	S 300	-
OB 5	/	OX 1	/	K 30	-
C 30	/	E 15	/	CIP 5	+
FOX 30	+	P 10	/	MY 15	/
CT 25	+	OT 30	/		

2.2. Antibiotic Susceptibility Assay

The antibiotic susceptibilities of *E. coli* were determined according to Wiegand et al. [17]. MICs of cefotaxime and ampicillin were tested in ranges of 25,000–0.00017 µg/mL and 25,000–48.83 µg/mL, respectively. The mean of the MICs of cefotaxime, observed for the bacterial strain, was 0.0225 µg/mL and the mean of the MICs of ampicillin was 390.625 µg/mL. Since the synergy is observed as significantly larger phage plaques in zones surrounding antibiotic disks where there is a sub-lethal concentration of the drug, the optimal antibiotic concentrations for effective PAS were deduced to be sub-MIC [4]. These concentrations were set up to 0.5 × MIC—for cefotaxime 0.011 µg/mL and for ampicillin 195.3 µg/mL.

2.3. Double-Layer Agar (DLA) Method Variables

Variables of the DLA method contained different variations of layers and different types of antibiotic additions in order to examine how it would affect plaque formation and PAS effect generation by the T₄₅ bacteriophage. Five different method models were tested in this study with suitable controls, giving seven different variables. Antibiotics were added in their sub-MIC concentrations, being 0.011 µg/mL for cefotaxime and 195.3 µg/mL for

ampicillin, or in the form of antibiotic disks. Photographs visualizing the results on Petri dishes—showing plaque sizes with their arrangement, were added to the Supplementary Materials (Figures S1 and S2).

The overall number of phage plaques per plate depended mainly on the antibiotic used. The ampicillin test (Figure 2B) showed less differentiation between results from different method modifications, as opposed to the cefotaxime test (Figure 2A). The addition of ampicillin showed no significant differences in plaque enumeration in any of the method modifications, compared to the control with no antibiotic, despite being able to trigger the PAS effect (Figure S1). However, the addition of cefotaxime caused significant changes in the number of plaques, depending on the type of DLA method modification. The largest total number of plaques was obtained during the addition of the antibiotic to the bottom agar with the presence of the top agar (“B with ctx + T”) (Figure 2A). This modification increased the number of plaques by 114% compared to the use of top agar alone (“T”) and by 37% compared to the standard DLA method containing bottom and top agar (“B + T”).

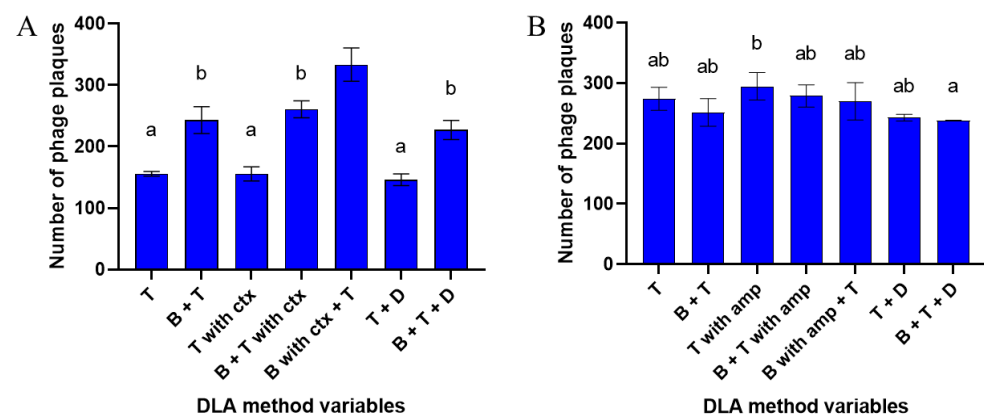


Figure 2. The total number of phage plaques per plate depending on the DLA method variable with the addition of (A) cefotaxime or (B) ampicillin. Top agar was marked as “T”, bottom agar as “B”, antibiotic disk as “D”, cefotaxime and ampicillin as “ctx” and “amp”, respectively. Phage was added to the top agar layers. Vertical bars indicate means \pm SD. a, b—means sharing the same superscript are not significantly different from each other at $p \leq 0.05$.

The results in the number of phage plaques divided into diameter ranges showed statistically significant differences between the type of method used and plaque sizes (Figure 3A,B). Overall, the addition of cefotaxime resulted in a larger amount of standard T₄₅ plaques of medium size (0.51–1 mm) and large, strong PAS-indicating plaques (1.01–1.5 mm) than in the presence of ampicillin but smaller amounts of small, standard T₄₅ plaques (<0.5 mm) compared to AMP addition. Furthermore, the best results were also obtained during the addition of the antibiotic to the bottom agar with the presence of the top agar (“B with ctx + T”) and with the application of the antibiotic disk onto the standard soft-agar overlay with the bottom layer present (“B + T + D”). For ampicillin, “B + T with amp” and “B with amp + T” modifications were equally effective in terms of forming different diameter plaques. For big, PAS-indicating plaque (0.51–1 mm) visualizations, antibiotic disk modifications (“T + D” and “B + T + D”) showed equally best results. Only the “B + T + D” variable was characterized by a greater amount of medium-sized, standard phage plaques due to the presence of a bottom layer (Figure 3B). Nevertheless, the addition of the liquid antibiotic, regardless of the modification method used, increased the overall number of medium-sized plaques, where the application of the antibiotic disks increased the overall number of large, PAS-indicating plaques.

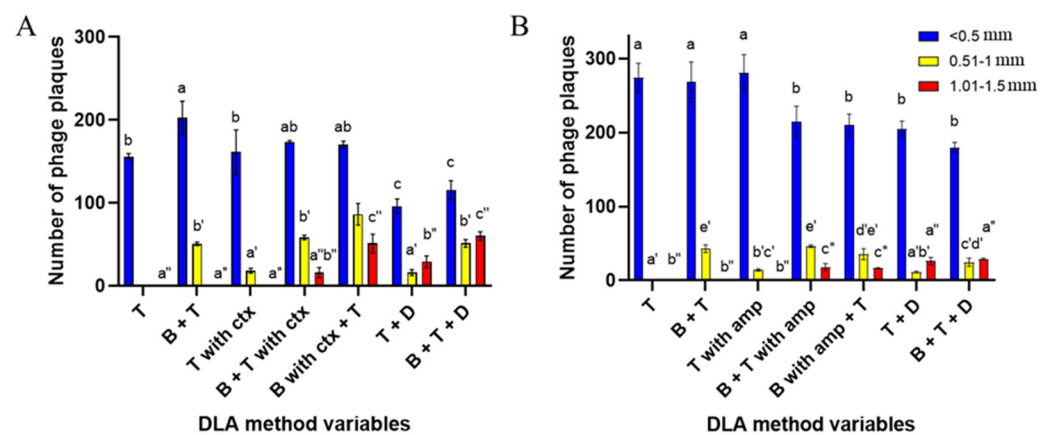


Figure 3. The number of phage plaques per plate divided into diameter ranges, depending on the DLA method variable with the addition of (A) cefotaxime or (B) ampicillin. Diameter ranges were established as follows: <0.5 mm—small, standard T4 plaques (blue bars), 0.51–1 mm—medium, standard T4 plaques (yellow bars), 1.01–1.5 mm—large, strong PAS-indicating plaques (red bars). Top agar was marked as “T”, bottom agar as “B”, antibiotic disk as “D”, cefotaxime and ampicillin as “ctx” and “amp”, respectively. Vertical bars indicate means \pm SD. a, b, c, . . . , a', b', c', . . . , and a'', b'', c'', . . . ,—means sharing the same superscript are not significantly different from each other at $p \leq 0.05$.

3. Discussion

Phage-antibiotic synergy was discovered many years ago, however, this effect was not fully characterized at that time and did not have its own name [18–20]. In the cited studies, antibiotics have been found to simply influence phage growth, for example, more phage formed in the presence of penicillin, or beta-lactam antibiotics stimulating phage development in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. In other more recent research, antibiotics were used to improve phage detection and enumeration, or for plating, phages forming very small plaques or no plaques under standard conditions by adding different antibiotics to the agar media in order to obtain plaques of larger diameter [15,16]. In the meantime, the PAS effect has been defined and described [10], which initiated interest in studies on the possible co-use of antibiotics and phages, primarily in terms of observing their synergies and additive effects. However, studies on the synergy effects with the use of the DLA technique differ in the way antibiotics are implemented [15,16]. That may have contributed to the non-uniform research results at the most important, method level. Taking this into consideration, an attempt was made to unify and standardize the method of effectively detecting the PAS effect at the initial step for T4-like bacteriophages; the most basic in vitro test on Petri plates.

Within this research, 43 antibiotics were used. The antibiotics belong to different classes (Table 2) because antibiotics with similar modes of action may result in different outcomes when combined with specific phages [21]. This statement is in line with the present study, where it was noted that three antibiotics from the β -lactam class (cefotaxime, ceftazidime, and ampicillin) demonstrated a very high possibility of synergy and 14 other antibiotics from different classes showed a likelihood of the existence of PAS—due to the probability of the appearance of the additive effect (Table 1). These were as follows: (β -lactams) aztreonam, amoxicillin/clavulanic acid, piperacillin, cefoperazone, piperacillin/tazobactam, ticarcillin, meropenem, ceftoxitin, (fluoroquinolones) marbofloxacin, flumequine, ciprofloxacin, (polymyxin antibiotic) colistin sulfate (sulfonamide with DHFR inhibitor), and trimethoprim-sulfamethoxazole.

Table 2. Antibiotics used in the PAS effect presence determination.

Mode of Action	Antibiotic Class	Antibiotic	Antibiotic Abbreviation	Company of Origin
Inhibition/disruption of the cell wall synthesis	β -lactams (penicillins, cephalosporins, cephamycins, carbapenems, monobactams)	Piperacillin	PRL	Oxoid
		Amoxicillin	AML	Oxoid
		Amoxicillin/clavulanic acid	AMC	Oxoid
		Penicillin G	P	Oxoid
		Cloxacillin	OB	Oxoid
		Oxacillin	OX	BioMaxima
		Ticarcillin	TC	Oxoid
		Piperacillin/tazobactam	TPZ	Oxoid
		Cefacetril 30 masticef	CEF	BioMaxima
		Ceftazidime	CAZ	BioMaxima
		Cephalexin	CL	Emapol
		Cefoperazone	CFP	Oxoid
		Cefuroxime	CXM	Oxoid
		Cefotaxime	CTX	BioMaxima
		Cefpodoxime	CPD	Emapol
		Meropenem	MEM	Oxoid
		Aztreonam	ATM	BioMaxima
	Cefoxitin	FOX	BioMaxima	
	Other (glycopeptides, polymyxins)	Vancomycin	VA	Oxoid
		Teicoplanin	TEC	Oxoid
Colistin sulfate		CT	Emapol	
Inhibition of protein synthesis	Amino-glycosides	Gentamicin	CN	Oxoid
		Amikacin	AK	Oxoid
		Tobramycin	TOB	Oxoid
		Streptomycin	S	Oxoid
		Kanamycin	K	Oxoid
		Doxycycline	DO	Oxoid
	Tetracyclines	Tigecycline	TGC	Oxoid
		Tetracycline	TE	Oxoid
		Oxytetracycline	OT	Oxoid
	Oxazolidinones	Linezolid	LNZ	BioMaxima
	Streptogramins	Chinopristina/dalfopristin	SYN	BioMaxima
	Chloramphenicol		C	BioMaxima
	Macrolides	Erythromycin	E	Oxoid
	Lincosamides	Clindamycin	DA	BioMaxima
		Lincomycin	MY	Oxoid
Fusidanes	Fusidic acid	FA	BioMaxima	
DNA synthesis inhibitors	Fluoroquinolones	Norfloxacin	NOR	Oxoid
		Ciprofloxacin	CIP	Oxoid
		Marbofloxacin	FOR CYL	BioMaxima
		Flumequine	UB	Oxoid
Folic acid synthesis inhibitors	Sulfonamides with dihydrofolate reductase (DHFR) inhibitor	Trimethoprim-sulfamethoxazole	SXT	Oxoid
RNA synthesis inhibitors	Rifamycins	Rifampicin	RA	BioMaxima

Comeau et al. [10] also reported the presence of the PAS effect on an *E.coli* strain with the addition of disks of cefotaxime and ceftazidime but with the use of *Siphoviridae* phage. In the experiments of others, there was also an increase in the T4-like phage plaques diameters in the presence of ampicillin, which was also found in the present study but also in the presence of kanamycin, tetracycline, and chloramphenicol [16]. The results of this study demonstrated that the application of chloramphenicol did not present any

particular effect, while kanamycin and tetracycline showed a possible antagonistic outcome. These differences may be caused by a different approach in antibiotics incorporation. The experiments were carried out using a standard DLA method with the addition of antibiotics in the form of disks placed on top of the soft-agar as described by Comeau et al. [10]. On the other hand, in research conducted by Łoś et al. [16] antibiotics were applied directly into the base-agar. Ciprofloxacin, which showed the probable appearance of additive effects in the experiment, also displayed a synergistic effect in *E. coli* inactivation combined with T4-like phage in the liquid culture [22]. The PAS effect was also reported to enhance biofilm removal by reducing the minimum biofilm eradication concentration value of cefotaxime against *E. coli* biofilms from 256 to 128 and 32 µg/mL when the medium (10^4 PFU/mL) and high (10^7 PFU/mL) T4 phage titers were added [4].

Due to the results of other authors [4,10] with cefotaxime successively recurring in many studies focusing on PAS, it was selected for further experiments. As cefotaxime was often tested and its PAS evocation is confirmed, it was found to be the best choice for the evaluation of the phage-antibiotic synergy effect with different variables of the double-layer agar method. Ampicillin was utilized as it showed the induction of the PAS effect similarly to cefotaxime, which was also confirmed in the results of other authors [16]. Ampicillin is also a widely used drug to treat *E. coli* infections [23]. Antibiotics susceptibility assay was conducted in order to acquire MICs, which were necessary to determine $0.5 \times \text{MIC}$ (sub-MIC) concentrations of antibiotics since synergy was originally observed as significantly larger phage plaques in zones surrounding antibiotic disks, where there is a sub-lethal concentration of the drug. $0.5 \times \text{MIC}$ was 0.011 µg/mL for cefotaxime and 195.3 µg/mL for ampicillin.

The final experiment consisted of testing different DLA method variables in order to standardize and evaluate which was the most efficient for phage-antibiotic synergy (PAS) effect detection. Standard “double-layer agar method” or “double overlay agar plaque assay” is used for the determination of the concentration of functional bacteriophage particles (titre), usually expressed as plaque-forming units (PFU/mL). The method is based on mixing phage suspension (lysate) dilutions with host bacteria in “soft” agar, distributing this mixture on a standard agar plate to solidify. After incubation (with conditions adapted to the host bacterium), plaques are visualized as clear zones in the bacterial lawn (Figure 4). The DLA method is used as the basis for the isolation of phages and their characterization (clear or turbid plaques, plaque sizes, and the presence/absence of a halo) [24].

Within the research, seven different DLA method modifications were tested in terms of antibiotic addition placement, as well as the presence or absence of the base agar with proper control plates. The addition of the antibiotic as antibiotic disks applied onto Petri plates was carried out as this was the first method used for the original PAS detection [10] and was successfully repeated by other authors [25,26]. The addition of an antibiotic to the soft LB agar was conducted because this was shown to be effective in many other studies [4,7,10,27], and the incorporation of the antibiotic to the base agar was added to allow a slow diffusion of the drug from the bottom layer into the bacterial growth zone [16]. Variables without the base agar were included because in some circumstances, the lower layer in the DLA method is skipped, and the semi-solid media may be poured directly into the plate, though this approach requires thicker agar layers [28].

The results of the study showed that the overall number of phage plaques per plate depended mainly on the antibiotic used. Despite triggering the PAS effect, the addition of ampicillin showed no significant differences in plaque enumeration in any of the method modifications that were used. However, in the case of cefotaxime, significant changes in the overall number of plaques were detected. Differences in the number of plaques depended on the type of the DLA method modification. The largest total number of plaques was obtained by the addition of an antibiotic to the bottom agar with the presence of the top agar, where bacterial and phage suspensions were mixed. This modification increased the number of plaques by 114% compared to the use of a top agar alone and by 37% compared to the standard DLA method containing bottom and top agar. In the case of the number of

phage plaques divided into diameter ranges, experiments showed statistically significant differences between the type of method used and the antibiotic on plaque sizes. Cefotaxime incorporation resulted in a greater amount of large, strong PAS-indicating plaques than in the presence of ampicillin, with the best results also obtained with the addition of the antibiotic to the bottom agar with the presence of the top agar, beside the antibiotic disk modification with the bottom layer. For ampicillin, big PAS-indicating plaques were most visible with antibiotic disk modifications, regardless of the presence of a bottom layer.

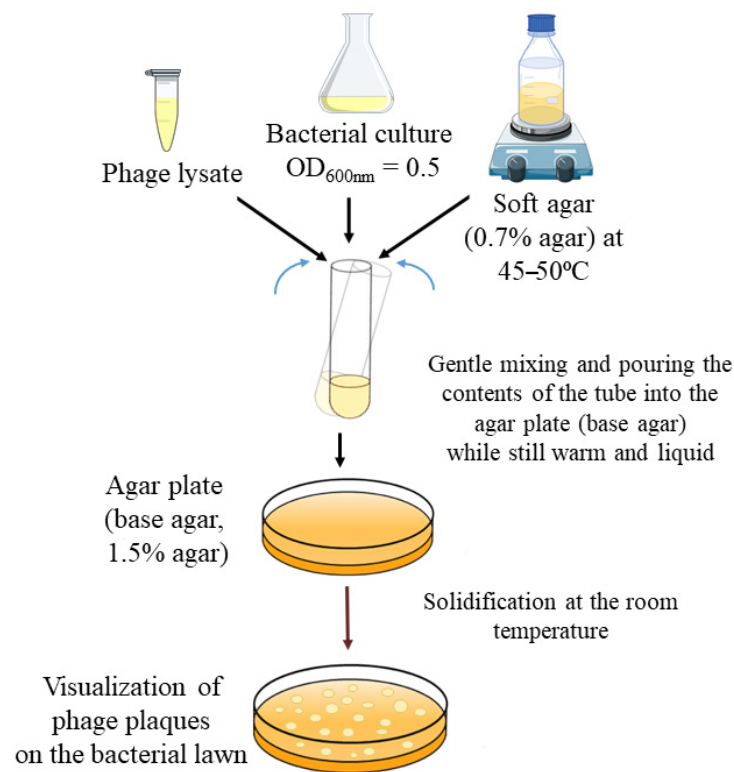


Figure 4. Standard double-layer agar (DLA) method visualization (prepared based on the methodology described by Kropinski et al. [24]).

The results of this study indicate, that even though an antibiotic can manifest the PAS effect with T4-like phage by the standard disk method, further examination should be carried out to verify if the effect will be equally satisfactory when applying the antibiotic directly into the agar. One of the antibiotics used enhanced the total number of phage plaques (cefotaxime), where the other did not (ampicillin), despite belonging to the same antibiotic class (β -lactams). However, ampicillin is a member of the penicillins group, and cefotaxime belongs to the cephalosporins, and as reported by other authors, phage and antibiotic synergistic and antagonistic interactions depend highly on the mechanism of bacterial inhibition and stoichiometry of the pairing [29], and cefotaxime tends to have a broader spectrum of activity compared with ampicillin [30]. Also, the choice of the DLA method variable seems to be mostly antibiotic type-dependent with regards to using the same bacteriophage and bacterial host. In order to visualize the PAS effect, disk modification showed the best results, where there was an overall increase in the different diameter phage plaques due to the application of the antibiotic directly into the bottom agar layer, which could be primarily due to the slow diffusion of the drug from the bottom layer into the zone of bacterial growth.

4. Materials and Methods

4.1. Bacterial Strains and Bacteriophage Propagation

Escherichia coli K-12 C600 [31] was used as a host strain for the propagation of bacteriophage T4₅ (own isolate, T4-like phages representative). Phage and bacterium were part of a Collection of the Department of Microbiology and Biotechnology, at the West Pomeranian University of Technology, Szczecin. The bacterium was stored using the Microbank™ system at −20 °C prior to the experiments. In order to recover the strain, beads were streaked directly to Luria-Bertani (LB agar) (BioMaxima, Lublin, Poland) plates and incubated at 37 °C for 24 h. Next, a single colony was streaked onto a new LB agar plate with the same incubation conditions and then used to inoculate 50 mL of LB broth. Bacterial cells were incubated at 37 °C and 160 rpm in an orbital rotating shaker (Shaker-Incubator ES-20, BioSan, Józefów, Poland) to reach $OD_{600nm} = 0.5$, corresponding to the exponential phase of growth and a titer of $\sim 2 \times 10^8$ CFU. Optical density values were measured using an Infinite 200 PRO NanoQuant microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland). The *E. coli* bacteriophage T4₅ was added at this point, and samples were incubated for the further stage until the cultures cleared, or after 3 h. Following incubation, chloroform was added to the culture (10%, *v/v*), and samples were vortexed for the next 5 min. The cultures were then centrifuged (Eppendorf Centrifuge model 5810 R, Hamburg, Germany) at $3500 \times g$ for 15 min at 4 °C, and the supernatant was collected and stored at 4 °C. Phage activity was tested by a double overlay agar plaque assay [24]. The clear plaque was picked with a pipette tip, and phages were suspended in TM buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgSO₄ at pH 7.5). Isolated phages were purified through a triple transfer of single plaque and propagated until homologous plaques were obtained. Decimal dilutions of lysates in a TM buffer were prepared to define the titer of the bacteriophage and subjected to the plaque assay using the double agar layer method. Plaques were counted on a dilution plate in spots containing 30–300 plaques. Results were expressed in plaque-forming units per mL. Bacteriophage stock suspension was stored at 4 °C.

4.2. Antibiotics Used for PAS Effect Occurrence

In order to detect which antibiotics may form the PAS effect, 43 different antibiotics were used (Table 2). The test was performed using a double-layer agar method combined with an antibiotic susceptibility assay with the use of a disk diffusion test in accordance with Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendations. Base LB agar (1.5%) plates were covered with top LB agar (0.7%) containing 500 µL of bacterial culture ($OD_{600nm} = 0.5$) and 100 µL of phage lysate (of approx. 1×10^7 PFU/mL). After top agar solidification, the antibiotic disks were applied. Plates were incubated for 24 h at 37 °C and then analyzed for the presence of the PAS effect. The presence of the PAS effect was determined according to Comeau et al. [10]. Synergy was observed as significantly larger phage plaques compared to the control, in zones surrounding antibiotic disks where there was a sub-lethal concentration of the drug [10].

4.3. Antibiotics Susceptibility Assay

Based on the previous experiment, cefotaxime and ampicillin were chosen for further testing. Ampicillin and cefotaxime (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) stock solutions of 50 mg/mL were prepared by diluting them in deionized water and filter sterilizing (0.2 µm; PES 25 mm syringe filter; VWR International, Radnor, PA, USA). The MICs of antibiotics were determined by using a 96-well microplate dilution protocol with minor modifications [17]. LB was used as the main medium in the test and freshly inoculated bacterial culture was incubated till it reached $OD_{600nm} = 0.2$ (which corresponds to 1×10^8 CFU/mL). The bacterial suspension was then diluted at 1:100 in the LB medium, which gave the final desired inoculum of 5×10^5 CFU/mL. The microtiter plate was incubated at 37 °C for 24 h. The MIC of the antibiotics for *E. coli* K-12 C600 bacterial strain was determined to be a concentration of antibiotic at which the optical density (OD_{600nm}) was equal to that of a cell-free blank control.

4.4. Double-Layer Agar (DLA) Method Variables

For the experiment, different variables of the double-layer agar method [24] were used in order to assess the presence of the phage-antibiotic synergy effect (Figure 5A–C). Various types of DLA methods included: adding the antibiotic to the soft agar, with and without base agar; adding the antibiotic to the base agar; and finally applying antibiotic disks onto plates with soft and base agar, or with only soft agar. Antibiotics in a liquid form were added to the agar media in concentrations of $0.5 \times \text{MIC}$. Proper control plates of the standard DLA method and soft agar were also conducted. Additionally, 5 mL of soft agar containing 100 μL of phage lysate was added at a titer of approx. 9.3×10^3 PFU/mL and 200 μL of *E. coli* was added when bacterial cells were in their exponential (log phase) of growth—at $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.5$. The experiment was carried out in triplicate.

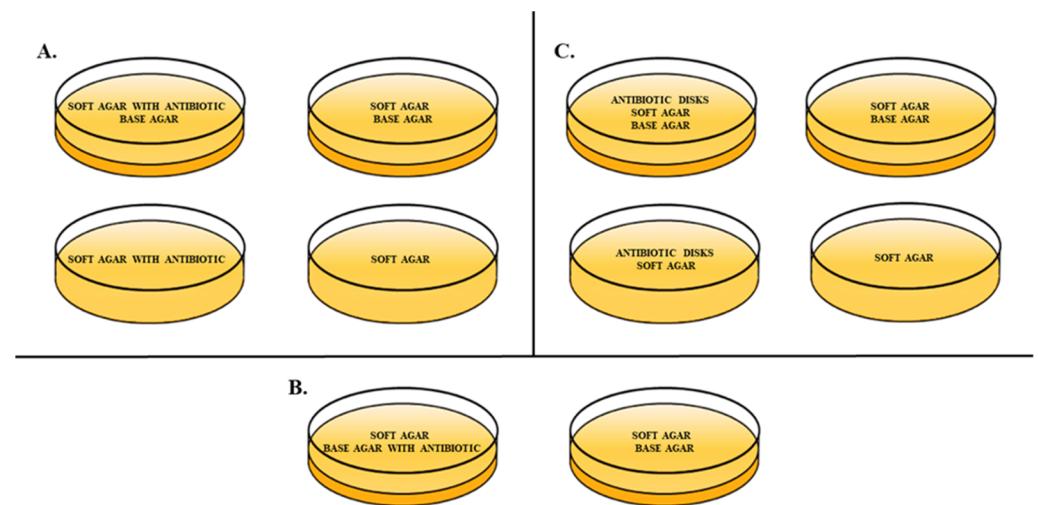


Figure 5. Types of DLA method modifications used in terms of antibiotic addition placement and the presence of a base agar with proper control plates; (A) addition of the antibiotic to the soft LB agar with and without base agar with control plates of a standard DLA method and soft agar, (B) addition of the antibiotic to the base LB agar with a standard DLA method control plate, (C) addition of the antibiotic as antibiotic disks applied onto plates with soft and base LB agar, or with only the soft LB agar with control plates of a standard DLA method and soft agar.

4.5. Statistical Analysis

The results were analyzed statistically with Statistica 13.3 TIBCO Software Inc. (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Shapiro–Wilk tests were used to evaluate the distribution of variables. One-way ANOVA was performed, and the significance of differences between the mean values of the number of phage plaques and the variables of the DLA method were calculated using a parametric Tukey test. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$.

5. Conclusions

In this work we tried to unify the DLA method to effectively detect the PAS effect for T4-like bacteriophages, at its most basic in vitro test. Our studies have shown that the choice of the method modification has an impact on the final results. The selection of the DLA method variable seems to be mostly antibiotic type-dependent with regards to using the same bacteriophage and bacterial host. This indicates that even though an antibiotic could manifest the PAS effect by a standard disk method, it would be worth examining if the effect is equally satisfactory when applying antibiotics directly into the agar.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antibiotics10111306/s1>, Figure S1: Photographs visualizing plaque sizes and arrangement with

the use of ampicillin in different variables of the DLA method, Figure S2: Photographs visualizing plaque sizes and arrangement with the use of cefotaxime in different variables of the DLA method.

Author Contributions: Conceptualization, X.S.; methodology, X.S., M.R. and J.J.; validation, X.S., M.R., J.J. and P.N.; formal analysis, X.S. and P.N.; investigation, X.S., M.R. and J.J.; resources, X.S. and P.N.; data curation, X.S.; writing—original draft preparation, X.S., P.N. and M.M.; writing—review and editing, X.S., P.N. and M.M.; visualization, X.S.; supervision, P.N. and M.M.; funding acquisition, P.N. and M.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors thank B. Grygorcewicz from the Pomeranian Medical University in Szczecin for the substantive help in designing the research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Alanis, A.J. Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Arch. Med. Res.* **2005**, *36*, 697–705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Sulakvelidze, A.; Alavidze, Z.; Morris, J.G. Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 649–659. [[CrossRef](#)]
3. Monk, A.B.; Rees, C.D.; Barrow, P.; Hagens, S.; Harper, D.R. Bacteriophage applications: Where are we now? *Letts. Appl. Microbiol.* **2010**, *51*, 363–369. [[CrossRef](#)]
4. Ryan, E.M.; Alkawareek, M.Y.; Donnelly, R.F.; Gilmore, B.F. Synergistic phage-antibiotic combinations for the control of *Escherichia coli* biofilms in vitro. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2012**, *65*, 395–398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Kirby, A.E. Synergistic action of gentamicin and bacteriophage in a continuous culture population of *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e51017. [[CrossRef](#)]
6. Coulter, L.B.; McLean, R.J.; Rohde, R.E.; Aron, G.M. Effect of bacteriophage infection in combination with tobramycin on the emergence of resistance in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Viruses* **2014**, *6*, 3778–3786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Kamal, F.; Dennis, J.J. *Burkholderia cepacia* complex phage-antibiotic synergy (PAS): Antibiotics stimulate lytic phage activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 1132–1138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Jo, A.; Kim, J.; Ding, T.; Ahn, J. Role of phage-antibiotic combination in reducing antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Food Sci. Biotechnol.* **2016**, *25*, 1211–1215. [[CrossRef](#)]
9. Nouraldin, A.A.M.; Baddour, M.M.; Harfoush, R.A.H.; Essa, S.A.M. Bacteriophage-antibiotic synergism to control planktonic and biofilm producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Alex. J. Med.* **2016**, *52*, 99–105. [[CrossRef](#)]
10. Comeau, A.M.; Tétart, F.; Trojet, S.N.; Prere, M.F.; Krisch, H.M. Phage-antibiotic synergy (PAS): β -lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. *PLoS ONE* **2007**, *2*, e799. [[CrossRef](#)]
11. Torres-Barceló, C.; Hochberg, M.E. Evolutionary rationale for phages as complements of antibiotics. *Trends Microbiol.* **2016**, *24*, 249–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Tagliaferri, T.L.; Jansen, M.; Horz, H.P. Fighting pathogenic bacteria on two fronts: Phages and antibiotics as combined strategy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2019**, *9*, 22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Chan, B.K.; Sistro, M.; Wertz, J.E.; Kortright, K.E.; Narayan, D.; Turner, P.E. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 26717. [[CrossRef](#)]
14. Kortright, K.E.; Chan, B.K.; Koff, J.L.; Turner, P.E. Phage therapy: A renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell Host Microbe* **2019**, *25*, 219–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Santos, S.B.; Carvalho, C.M.; Sillankorva, S.; Nicolau, A.; Ferreira, E.C.; Azeredo, J. The use of antibiotics to improve phage detection and enumeration by the double-layer agar technique. *BMC Microbiol.* **2009**, *9*, 148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Łoś, J.M.; Golec, P.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, A.; Łoś, M. Simple method for plating *Escherichia coli* bacteriophages forming very small plaques or no plaques under standard conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 5113–5120. [[CrossRef](#)]
17. Wiegand, I.; Hilpert, K.; Hancock, R.E.W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 163–175. [[CrossRef](#)]
18. Price, W.H. Bacteriophage formation without bacterial growth: I. Formation of *Staphylococcus* phage in the presence of bacteria inhibited by penicillin. *J. Gen. Physiol.* **1947**, *31*, 119. [[CrossRef](#)]
19. Krueger, A.P.; Cohn, T.; Smith, P.N.; McGuire, C.D. Observations on the effect of penicillin on the reaction between phage and staphylococci. *J. Gen. Physiol.* **1948**, *31*, 477–488. [[CrossRef](#)]
20. Hadas, H.; Einav, M.; Fishov, I.; Zaritsky, A. Bacteriophage T4 development depends on the physiology of its host *Escherichia coli*. *Microbiology* **1997**, *143*, 179–185. [[CrossRef](#)]
21. Segall, A.M.; Roach, D.R.; Strathdee, S.A. Stronger together? Perspectives on phage-antibiotic synergy in clinical applications of phage therapy. *Curr. Opin. Microbiol.* **2019**, *51*, 46–50. [[CrossRef](#)]
22. Lopes, A.; Pereira, C.; Almeida, A. Sequential combined effect of phages and antibiotics on the inactivation of *Escherichia coli*. *Microorganisms* **2018**, *6*, 125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

23. Kennedy, W.P.U.; Wallace, A.T.; Murdoch, J.M. Ampicillin in treatment of certain gram-negative bacterial infections. *Br. Med. J.* **1963**, *2*, 962. [[CrossRef](#)]
24. Kropinski, A.M.; Mazzocco, A.; Waddell, T.E.; Lingohr, E.; Johnson, R.P. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. In *Bacteriophages. Methods in Molecular Biology*; Clokie, M.R., Kropinski, A.M., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2009; Volume 501, pp. 69–76.
25. Jo, A.; Ding, T.; Ahn, J. Synergistic antimicrobial activity of bacteriophages and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Food Sci. Biotechnol.* **2016**, *25*, 935–940. [[CrossRef](#)]
26. Uchiyama, J.; Shigehisa, R.; Nasukawa, T.; Mizukami, K.; Takemura-Uchiyama, I.; Ujihara, T.; Murakami, H.; Imanishi, I.; Nishifuji, K.; Sakaguchi, M.; et al. Piperacillin and ceftazidime produce the strongest synergistic phage–antibiotic effect in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Virol.* **2018**, *163*, 1941–1948. [[CrossRef](#)]
27. Kaur, S.; Harjai, K.; Chhibber, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* phage plaque size enhancement using sublethal concentrations of antibiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 8227–8233. [[CrossRef](#)]
28. Abedon, S.T. Detection of bacteriophages: Phage plaques. In *Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy*; Harper, D., Abedon, S., Burrowes, B., McConville, M., Eds.; Springer International Publishing AG: Cham, Switzerland, 2018; pp. 9–10.
29. Gu Liu, C.; Green, S.I.; Min, L.; Clark, J.R.; Salazar, K.C.; Terwilliger, A.L.; Kaplanc, H.B.; Trautnera, B.W.; Ramig, R.F.; Maresso, A.W. Phage-antibiotic synergy is driven by a unique combination of antibacterial mechanism of action and stoichiometry. *mBio* **2020**, *11*, e01462-20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Payne, O.B.; Ericson, J.E. Chapter 2—Empiric Antimicrobials for Neonatal Sepsis. In *Infectious Disease and Pharmacology*; Benitz, W.E., Smith, P.B., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 15–25.
31. Appleyard, R.K. Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. *Genetics* **1954**, *39*, 440–452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Article

Nanoparticles Influence Lytic Phage T4-like Performance In Vitro

Xymena Stachurska ^{1,*}, Krzysztof Cendrowski ², Kamila Pachnowska ^{3,4}, Agnieszka Piegat ⁵, Ewa Mijowska ⁴ and Paweł Nawrotek ¹

¹ Department of Microbiology and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Animal Husbandry, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Piastów Avenue 45, 70-311 Szczecin, Poland; pawel.nawrotek@zut.edu.pl

² Faculty of Civil and Environmental Engineering, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Piastów Avenue 50a, 70-311 Szczecin, Poland; krzysztof.cendrowski@zut.edu.pl

³ Department of Horticulture, Faculty of Environmental Management and Agriculture, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Juliusza Słowackiego 17, 71-434 Szczecin, Poland; kamila.pachnowska@zut.edu.pl

⁴ Department of Nanomaterials Physicochemistry, Faculty of Chemical Technology and Engineering, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Piastów Avenue 45, 70-311 Szczecin, Poland; ewa.mijowska@zut.edu.pl

⁵ Department of Polymer and Biomaterials Science, Faculty of Chemical Technology and Engineering, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Piastów Avenue 42, 71-065 Szczecin, Poland; agnieszka.pieगत@zut.edu.pl

* Correspondence: xymena.stachurska@zut.edu.pl



Citation: Stachurska, X.; Cendrowski, K.; Pachnowska, K.; Piegat, A.; Mijowska, E.; Nawrotek, P. Nanoparticles Influence Lytic Phage T4-like Performance In Vitro. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7179. <https://doi.org/10.3390/ijms23137179>

Academic Editor: Alexandru Mihai Grumezescu

Received: 22 May 2022

Accepted: 26 June 2022

Published: 28 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Little is known about interactions of non-filamentous, complex-structured lytic phages and free, non-ordered nanoparticles. Emerging questions about their possible bio-sanitization co-applications or predictions of possible contact effects in the environment require testing. Therefore, we revealed the influence of various nanoparticles (NPs; SiO₂, TiO₂-SiO₂, TiO₂, Fe₃O₄, Fe₃O₄-SiO₂ and SiO₂-Fe₃O₄-TiO₂) on a T4-like phage. In great detail, we investigated phage plaque-forming ability, phage lytic performance, phage progeny burst times and titers by the eclipse phase determinations. Additionally, it was proved that TEM micrographs and results of NP zeta potentials (ZP) were crucial to explain the obtained microbiological data. We propose that the mere presence of the nanoparticle charge is not sufficient for the phage to attach specifically to the NPs, consequently influencing the phage performance. The zeta potential values in the NPs are of the greatest influence. The threshold values were established at ZP < −35 (mV) for phage tail binding, and ZP > 35 (mV) for phage head binding. When NPs do not meet these requirements, phage–nanoparticle physical interaction becomes nonspecific. We also showed that NPs altered the phage lytic activity, regardless of the used NP concentration. Most of the tested nanoparticles positively influenced the phage lytic performance, except for SiO₂ and Fe₃O₄-SiO₂, with a ZP lower than −35 (mV), binding with the phage infective part—the tail.

Keywords: nanoparticles; lytic bacteriophage; interaction; physical attachment; zeta potential

1. Introduction

Bacteriophages (phages), viruses specific to bacterial cells, are a powerful tool for building a variety of self-organizing nanostructures that can be used in the diagnosis and treatment of many diseases [1]. Interest in phages grew rapidly in the face of the ineffectiveness of routinely used therapeutic methods, although their use has not yet been widely adopted by modern medicine, with the exception of Georgia, Russia and Poland, where therapeutic phages have been used for a long time [2]. They show a significant antibacterial potential and, as passable bacteriolytic units, they are used in the mono-phage or multi-phage (phage cocktails) therapy of bacterial diseases, including those caused by

multi-drug-resistant strains [2–4]. Phages represent the most numerous (approx. 10^{31}) and probably the oldest, the most genetically diverse and the fastest replicating (approx. 10^{23} infections/s. on the Earth scale) biological form [5,6]. The biochemical complexity of the molecules that make up the phage virion and its varied size, expressed on the nanometric scale, mean that bacteriophages can be treated as natural nanoparticles made of molecules with different charge and hydrophobicity, which can also interact with other materials, including nanomaterials [7–9].

Nanomaterials, in turn, are structures produced at the nano scale, at least one dimension of which ranges from 1 to 100 nm, and thanks to the favorable ratio of surface area to their volume, they can be more biologically active than macroparticles with the same chemical composition [10–14]. The sizes of nanomaterials, similar to subcellular elements, allow them to penetrate through natural barriers, such as biological membranes, so that, after being introduced into the body, they can reach the smallest vessels and any types of cells [10,11]. Currently, due to the large variety of nanomaterials, they are proposed for use in the diagnosis and treatment of diseases (fluorescent biological labels, drug and gene delivery, detection of pathogens and proteins, probing of DNA structure, tissue engineering, tumor destruction, separation and purification of biological molecules), manufacturing and materials, environment, electronics, energy harvesting, food and agriculture [15–17]. Above all, their high antimicrobial activity is emphasized, which is an alternative to the currently used methods of neutralizing pathogens [18,19].

The application potential of bacteriophages or nanomaterials is currently being intensively developed, and at the same time, attempts are being made to increase their action and significance by obtaining synergistic effects [20,21]. On the other hand, the creation of biohybrids composed of both inorganic nanoparticles and phage biomolecules, opens new potential applications in very different fields, including medicine or nanobiotechnology [22,23].

Prospectively, it is possible to develop specific strategies based on a combination of phage and nanomaterials, used not only for eradication but also for sanitization, biocontrol or bioconservation, in the case of most bacterial pathogens, including drug-resistant and biofilm-forming bacteria [24,25]. It is also desirable to have an enhanced bactericidal effect, most preferably synergy, as it is proven for some antibiotics and bacteriophages [3,26,27]. In the case of phage–antibiotic synergy (PAS), it was shown that antibiotic and phage resistance have a small probability of emergence at the same time and bacteria resistant to one agent will be susceptible to the other agent [28]. Moreover, selective pressure of bacteriophage promotes phage-resistant mutations in bacteria, although with a weakening of their fitness. Such fitness trade-offs include reduced virulence, resensitization to antibiotics and colonization defects [29–33]. Therefore, similar effects can be expected in the context of the simultaneous use of lytic bacteriophages and nanoparticles.

With the current state of the art, the topic of phage–nanoparticle interactions mostly focuses on designing novel, functional materials and composites, mainly bioactive surfaces and biotemplate designs [34]. However, not much is known about the contact effects of non-filamentous lytic phages (especially those of complex head–tail structure) and non-ordered nanoparticles, with particular emphasis on their interactions. For that reason, in this work, we assessed the potential in lytic phage T4-like and nanoparticle co-application, primarily with a focus on the potential influence of nanoparticles on phage lytic activity.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Host and Bacteriophage

Lytic bacteriophage T4₅ was used, as a model for T4-like phages. *Escherichia coli* K-12 C600 [35] was used as a host strain for the phage propagation [3]. Bacterium and phage were part of a collection from the Department of Microbiology and Biotechnology at the West Pomeranian University of Technology, Szczecin. Bacterium revival and phage propagation were conducted as described previously [3]. Briefly, after storing in the Microbank™ system at -20 °C, the bacterium was revived on Luria-Bertani (LB agar) (BioMaxima, Lublin, Poland) plates and incubated at 37 °C for 24 h. Afterwards, 50 mL of LB broth was

inoculated with a single colony of *E. coli*, and incubated at 37 °C with shaking (160 rpm) in an orbital rotating shaker (Shaker-Incubator ES-20, BioSan, Józefów, Poland) to reach $OD_{600nm} = 0.5$ (exponential phase of growth and a titer of approx. 2×10^8 CFU). Optical density values were measured using an Infinite 200 PRO NanoQuant microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland). Afterwards, bacteriophage was added and samples were further incubated until the lysis occurred. For lysate purification, chloroform was added (10%, *v/v*) and samples were vortexed for 5 min, and then centrifuged (Eppendorf Centrifuge model 5810 R, Hamburg, Germany) at 5000 rpm for 15 min at 4 °C. The supernatant was stored at 4 °C for further use. Phage activity and titer was tested by a double-overlay agar plaque assay [36].

2.2. Chemical Reagents

Titanium dioxide particles were obtained from the AEROXIDE® TiO₂ P 25 (Evonik, Essen, Germany). The Fe₃O₄ particles used as a core for the nanostructures and as reference samples were purchased from Sigma Aldrich (637106) and were used as received. The nanomagnetite structure size was 50–100 nm (purity 97%, according to information provided by the supplier). Titanium (IV) butoxide (TBT) and hexadecyl (trimethyl)azanium bromide (CTAB) were purchased from Sigma Aldrich (MERCCK, Darmstadt, Germany). Ethanol, propanol and 30% hydrochloric acid ammonia solution were bought from Chempur (Piekary Slaskie, Poland).

2.3. Nanoparticle Synthesis

2.3.1. Synthesis of Silica Shell on Iron Oxide Nanoparticles (SiO₂-Fe₃O₄) and Their Functionalization with Titanium Dioxide (SiO₂-Fe₃O₄-TiO₂)

In order to create a mesoporous shell on the surface of iron oxide particles (Fe₃O₄-SiO₂), 2 g of Fe₃O₄ and 0.930 g of hexadecyl (trimethyl)azanium bromide (CTAB) were dispersed in 200 mL of ethanol (EtOH) mixed together with 300 mL of water and 2.5 mL of ammonia solution (NH₃ × H₂O). The dispersion of the iron oxide particles in ethanol–water solution was obtained by simultaneous stirring and sonication. Further, 1.5 mL of tetraethyl orthosilicate (TEOS) was added and kept stirring for 18 h at room temperature. The obtained particles were separated with a magnet and dried in air. In the last step, the nanostructures were annealed at 500 °C for 2 h to remove CTAB blocking the pores. The silica shell synthesis was reported previously [37].

Iron oxide particles with mesoporous silica shell (Fe₃O₄-SiO₂) were functionalized with titanium dioxide according to previously described method [38,39]. Fe₃O₄-SiO₂ structures after annealing were added to the concentrated TBT in order to fill pores with TiO₂. The mixture of Fe₃O₄-SiO₂ and TBT was then sonicated for 2 h in an ultrasonic washer at 50 °C. Then Fe₃O₄-SiO₂ structures were separated from the concentrated TBT using magnet and washed with isopropanol. After washing with isopropanol, nanostructures were washed with ethanol to hydrolyze remaining TBT and dried in air at 60 °C. The dried material was heated in an inert atmosphere for 2 h at 400 °C.

2.3.2. Synthesis of Silica Nanospheres (SiO₂) and Functionalization with Titanium Dioxide

Mesoporous silica nanospheres were prepared according to the previously reported Stöber method [39,40]. Briefly, synthesis of mesoporous silica nanospheres was performed by mixing 50 mL ethanol (EtOH) and 2.5 mL of ammonia solution (NH₃ × H₂O) together in a glass-bottomed flask. Ethanol and ammonium solution were stirred using magnetic stirrer. After mixing them together, 1.5 mL of tetraethyl orthosilicate (TEOS) was added to the flask and stirred for 24 h at room temperature. The obtained silica particles were obtained by evaporation solvents.

In the next step, to create a mesoporous external layer on the as-produced silica core particles (SiO₂), mixture of 200 mg of silica spheres, 160 mg CTAB; 0.48 mL NH₃ × H₂O; 100 mL EtOH; and 120 mL H₂O was prepared [40]. In order to homogeneously disperse the solution, obtained mixture was simultaneously stirred and sonicated. After obtaining

a homogeneous suspension, 0.28 mL TEOS was added and the mixture was stirred for a further 24 h. The suspension was then evaporated and obtained product was annealed in air at 500 °C for 2 h.

The modification of mesoporous channels in silica nanospheres with titanium dioxide (TiO₂-SiO₂) was made according to the previous procedure [38,39]. As such, 100 mg of silica core-shell structures was added to the 3 mL of concentrated TBT. Then, the suspension was sonicated for 3 h in anhydrous conditions at 50 °C. The suspension was then diluted with propanol and centrifuged to separate the excess of titanium dioxide precursor. In order to remove the excess of TBT, the sample was washed several times with propanol. After the purification step, the nanostructures filled with TBT were treated with ethanol to hydrolyze the precursor to the titanium dioxide. Finally, the sample was evaporated and heated in an air flow at 400 °C for 2 h to transform the titanium dioxide into its anatase phase.

2.4. Nanoparticle Microscopic Analysis, Zeta Potentials and Stock Suspension Preparation

Visualization of nanomaterials was performed using a transmission electron microscope (TEM; Tecnai G2 F20 S-TWIN; FEI, Hillsboro, OR, USA) equipped with a high-angle, annular, dark-field HAADF detector (STEM) and with energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS). In order to characterize the crystal structure of the samples, X-ray powder diffractometer (XRD, Aeris, Malvern Panalytical) with Cu-K α radiation ($\lambda = 1.544 \text{ \AA}$) and an accelerating voltage of 40 kV was used.

For zeta potential analysis Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) with a 633 nm red laser was used. All water-based dispersions of nanoparticles were sonicated for 30 min, directly before measurements in ultrasonic bath. For the analysis, the nanoparticle sample of the desired concentration (5 mg/mL) was flushed through a folded capillary cell and the measurement was carried out if there were no visible air bubble inclusions present. The cell was placed into the Zetasizer and equilibrated at 20 °C (close to the average temperature in the laboratory) for 2 min, of which there were three replications.

For stock suspension preparation, nanoparticles were placed in the glass tubes and sterile deionized water was added to reach a concentration of 10 mg/100 μ L in each tube. Samples were thoroughly vortexed for 10 min and then sonified in the ultrasonic cleaner (2 \times 30 min) by submerging the tubes to ensure particle dispersion.

2.5. Coincubation Assay for Plaque-Forming Ability Determination

In order to test phage T4₅ plaque-forming ability in the presence of nanoparticles, coincubation assay was carried out. Briefly, 1980 μ L of TM buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgSO₄ at pH 7.5) and 20 μ L of phage lysate (1.2×10^{14} PFU/mL) were added into wells of 12-well flat-bottom polystyrene plates. Then, nanoparticles were added to reach final concentrations of 0.5, 0.1 and 0.05 mg/mL. TM buffer with phage lysate and nanoparticle-free deionized water was used as a control. Samples were incubated at room temperature (22 °C) and 160 rpm in an orbital rotating shaker. Then, samples were collected immediately and after every 12 h, centrifuged at 5000 rpm for 2 min at 4 °C, and the supernatant was spotted on the double-layer agar plates. The experiment was conducted in triplicate.

2.6. Bacteriophage Lysis of Liquid Culture

For the host culture lysis studies in the presence of nanoparticles, 100 μ L of an overnight culture of bacteria was refreshed in 2 mL of LB medium (BioMaxima, Lublin, Poland) in 12-well flat-bottom polystyrene plates and allowed to grow at 37 °C with shaking (160 rpm) until reaching OD_{600nm} = 0.2. Then each culture was infected with the phage at MOI (multiplicity of infection) = 0.1 and nanoparticles were added to reach final concentrations of 0.5, 0.1 and 0.05 mg/mL. The OD_{600nm} measurements of the samples were made every 30 min by collecting 100 μ L of the sample supernatant into the 96-well flat-bottom polystyrene plates, in order to avoid false measurements caused by nanoparticles. LB medium was used as the blank sample, bacterial culture with phage-free buffer and nanoparticle-free deionized water was used as *E. coli* growth control and bacterial culture

with phage lysate and nanoparticle-free deionized water was used as lysis control. The experiment was technically repeated three times, conducted in triplicate.

2.7. Determination of Phage Eclipse Period

In order to assess the time between phage infection and the appearance of phage progeny within the cell (intracellular phage/total phage) in the presence of nanoparticles, phage eclipse periods were estimated. As such, 10 mL of LB medium was inoculated with 100 μ L of an overnight culture of *E. coli*. The culture was grown until $OD_{600nm} = 0.5$ and then centrifuged (3500 rpm for 5 min at 4 °C) and the pellet was suspended in 5 mL of fresh LB medium. At this point, the culture was infected with the phage at $MOI = 0.01$ and incubated with shaking (160 rpm) at 37 °C for 2 min. Then, 100 μ L of infected cells was transferred to 5 mL of fresh LB broth in 12-well flat-bottom polystyrene plates and nanoparticles were added to reach final concentrations of 0.5, 0.1 and 0.05 mg/mL (time 0) and incubated at 37 °C with shaking (160 rpm). Samples were collected every 2 min, treated with chloroform (10%, *v/v*), vortexed for 1 min and then centrifuged at 5000 rpm for 5 min. The number of PFU per mL was estimated by titration using the double-layer agar plate method. The experiment was conducted in triplicate.

2.8. Microscopic Visualization of Phage–Nanoparticle Interactions

For phage purification, polyethylene glycol (PEG) 8000 (Pol-Aura, Dywity, Poland) with NaCl (Pol-Aura, Dywity, Poland) (final concentration 10% *w/v* PEG, 0.5 M NaCl) was added to the phage lysate and mixed thoroughly by inversion. The mixture was stored overnight at 4 °C, to allow the phage particles to form a precipitate. The precipitate was collected by centrifugation at 5000 rpm for 1.5 h at 4 °C. Supernatant was carefully discarded and the pellet was gently suspended in the TM buffer and left overnight at 4 °C. Then, PEG8000 was removed and phage particles were extracted by adding an equal volume of chloroform to the sample, vortexing for 20 min and centrifugating at 5000 rpm for 15 min at 4 °C. The upper phase containing phages was further purified by filtrating with a 0.22 μ m PES filter. For phage morphology determination, phage particles were deposited on formvar/carbon-coated copper grids (400 mesh) and stained with UranylLess stain solution (Delta Microscopies, Mauressac, France) (the protocol available on <http://uranylless.com>, accessed on 1 October 2020). For phage–nanoparticle interaction visualization, purified phage T4₅ was mixed with the highest nanoparticle concentrations (0.5 mg/mL), prior to deposition on grids and staining.

2.9. Statistical Analysis

One-way ANOVA was used to statistically analyze the results, along with Dunnett's multiple comparisons test. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$. All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 8.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). All data are presented as mean with standard deviation (SD).

3. Results

3.1. Nanomaterials Characterization

TEM images of commercial titanium dioxide particles are presented in Figure 1A,A'. Titanium dioxide particles have a spherical-like shape with size in a range between 20 and 50 nm. According to information provided by the supplier, P25 has a surface area between 35 and 65 m²/g and chemical composition of anatase and rutile.

Detailed information on the iron oxide and iron oxide particles with silica shell is published in our previous work [37]. TEM images of the Fe₃O₄ and Fe₃O₄-SiO₂ morphology show cube-like structures in a hexagonal shape, with particle size in a range of 50–100 nm for Fe₃O₄ (Figure 1D,D') and 60–120 nm for Fe₃O₄-SiO₂ (Figure 1E,E'). The Fe₃O₄ is composed from the magnetite phase, as are the Fe₃O₄-SiO₂ particles [37].

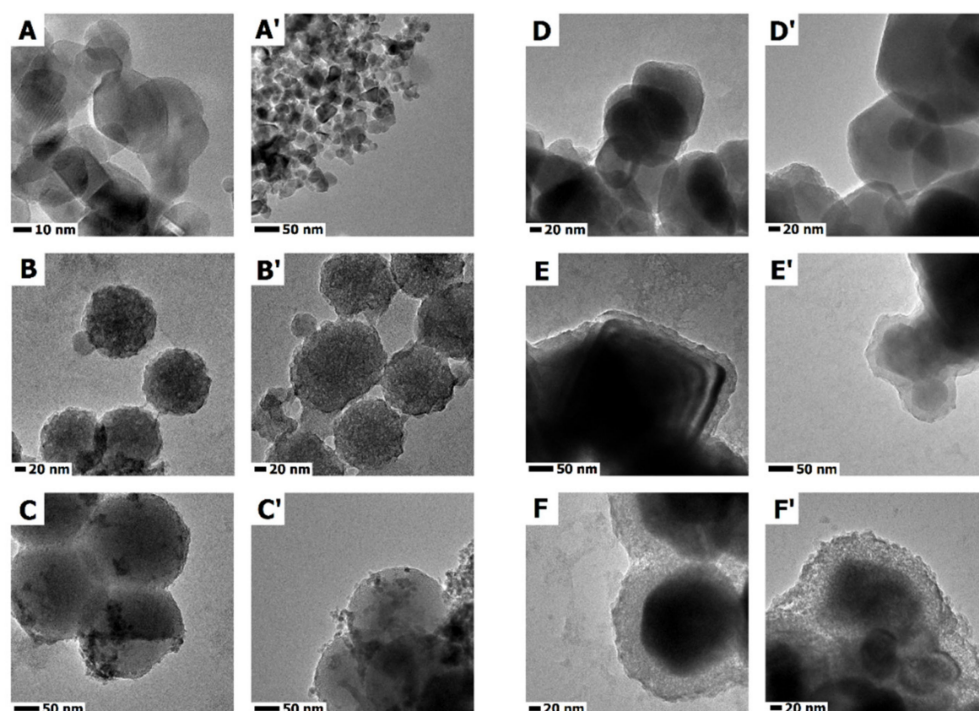


Figure 1. TEM images of titanium dioxide (A,A'); mesoporous silica spheres (B,B'); mesoporous silica spheres modified with titanium dioxide (C,C'); iron oxide particles (D,D'); covered with mesoporous silica shell before (E,E') and after functionalization with titanium dioxide (F,F').

The synthesized $\text{SiO}_2\text{-Fe}_3\text{O}_4\text{-TiO}_2$ is presented in Figure 1F,F'. $\text{SiO}_2\text{-Fe}_3\text{O}_4\text{-TiO}_2$ particles have similar shape and structure to $\text{SiO}_2\text{-Fe}_3\text{O}_4$ particles, with solid, cubic core (from dense material) and mesoporous silica shell. The mesoporous silica shell of $\text{SiO}_2\text{-Fe}_3\text{O}_4\text{-TiO}_2$ is filled with titanium dioxide. On the surface of the silica shell of the $\text{SiO}_2\text{-Fe}_3\text{O}_4\text{-TiO}_2$, there are noticeable darker agglomerates of titanium dioxide. The XRD analysis presented in the Supplementary Material (Supplementary Material, Figure S1) proves that the structures are composed of iron oxide and titanium dioxide.

Detailed information on the SiO_2 and $\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$ chemical, physical and photocatalytic properties is presented in our previous publications [38,39]. Our work showed that the nanomaterials are characterized by high purity and high surface area. According to the TEM images, the synthesized materials have a spherical shape and are built from a solid core, with a mesoporous shell of SiO_2 (Figure 1B,B'). TEM images presented in Figure 1C,C' show that the mesoporous channels were filled with titanium dioxide. Additionally, titanium dioxide agglomerates (darker particles) can be noticed on the surface of the silica nanospheres. EDS mapping proved that the titanium dioxide is in the external mesoporous silica layer of $\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$. The obtained materials are composed of silica, oxygen and titanium elements [40,41]. Titanium dioxide in mesopores is mostly in the anatase phase [41]. The synthesized photocatalyst shows high catalytic performance in the degradation of dyes [41], other organic pollutants [40] and shows antibacterial activity [42].

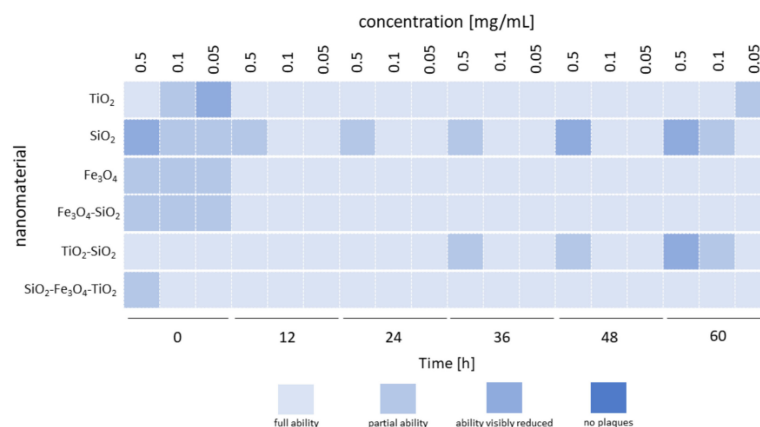
The Zeta potential analysis is presented in Table 1. From all of the studied materials, the highest maximal and minimal zeta potential charges had titanium dioxide (positive charge of 36 mV) and silica particles (negative charge -51 mV). The core-shell structure of silica and titanium dioxide $\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$ also shows negative charge at -25 mV. The third important material used in the presented studies was iron oxide particles. These particles showed a slightly negative zeta potential charge of -1.1 mV. Due to the combination of iron oxide cores and silica shell, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ showed a highly negative charge at -37 mV. As presented in Table 1, titanium dioxide has the highest positive charge, but in combination with highly negative silica and almost passive iron oxide charge, the $\text{SiO}_2\text{-Fe}_3\text{O}_4\text{-TiO}_2$ particles showed negative charge at -19 mV.

Table 1. Characteristics of the tested nanoparticles.

Material Type	Material Abbreviation	Zeta Potential [mV]
Silica nanospheres	SiO ₂	-51 ± 0.3
Meoporous silica nanospheres completed with titanium dioxide	TiO ₂ -SiO ₂	-25 ± 0.4
Titanium dioxide	TiO ₂	36.5 ± 6
Iron oxide nanocubes	Fe ₃ O ₄	-1.1 ± 1
Iron oxide nanocubes covered with silica shell	Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	-37.6 ± 0.6
Iron oxide nanocubes covered with mesoporous silica shell completed with titanium dioxide	SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	-19.5 ± 0.2

3.2. Coincubation Assay

The results of this experiment are shown in Figure 2. Phage T4₅'s ability to form plaques after incubation with different nanoparticles was determined with comparison to the control (without the addition of nanoparticles). "Full ability" was assessed when spot-plaque morphology was the same as in the control spot-plaque (complete clearance of the bacterial lawn in the location of the spot); "partial ability" when in spot-plaque location, small, single phage plaques were observed; "ability visibly reduced" when in spot-plaque location, visible reduction of the small, single phage plaques was observed; "no plaques" when in spot-plaque location, no single phage plaques were observed. Detailed visualization of the results plate can be found in the Supplementary Material (Figure S2).

**Figure 2.** Phage plaque-forming ability after coincubation with selected nanoparticles.

The most noticeable differences in the ability of the phage to form plaques occurred at time 0—immediately after adding the nanoparticles to the phage suspension (Figure 2). The highest concentration of nanoparticles (0.5 mg/mL) resulted in pronounced changes ("partial ability" or "ability visibly reduced") in plaque visibility for most samples, but for titanium dioxide (TiO₂), the lowest concentration (0.05 mg/mL) resulted in the most notable changes in the plaque-forming ability of the bacteriophage ("ability visibly reduced"). For samples with SiO₂ nanoparticles, changes in the visibility of plaques were maintained throughout the incubation period (60 h), with the most abundant changes ("ability visibly reduced") at 48 and 60 h of incubation, but only at the highest concentration of the nanoparticles (0.5 mg/mL). Changes were also recorded at 60 h of incubation, at a concentration of 0.1 mg/mL. In samples with TiO₂-SiO₂ nanoparticles, the reduction in plaque-forming ability was only observed at 36, 48 and 60 h of incubation at the highest nanoparticle concentration, and similarly to SiO₂, at 60 h of incubation, at the concentration of 0.1 mg/mL (Figure 2).

3.3. Bacteriophage Lytic Performance

For the lysis ability test, bacteriophage T4₅ performance against *E. coli* was tested in the presence of selected nanoparticles at different concentrations (0.5, 0.1 and 0.05 mg/mL),

by the changes in optical density measures. Phage lytic performance was assessed by the analysis of areas under the lysis curves at 180, 210 and 240 min of incubation, when differences were most pronounced (Figure 3).

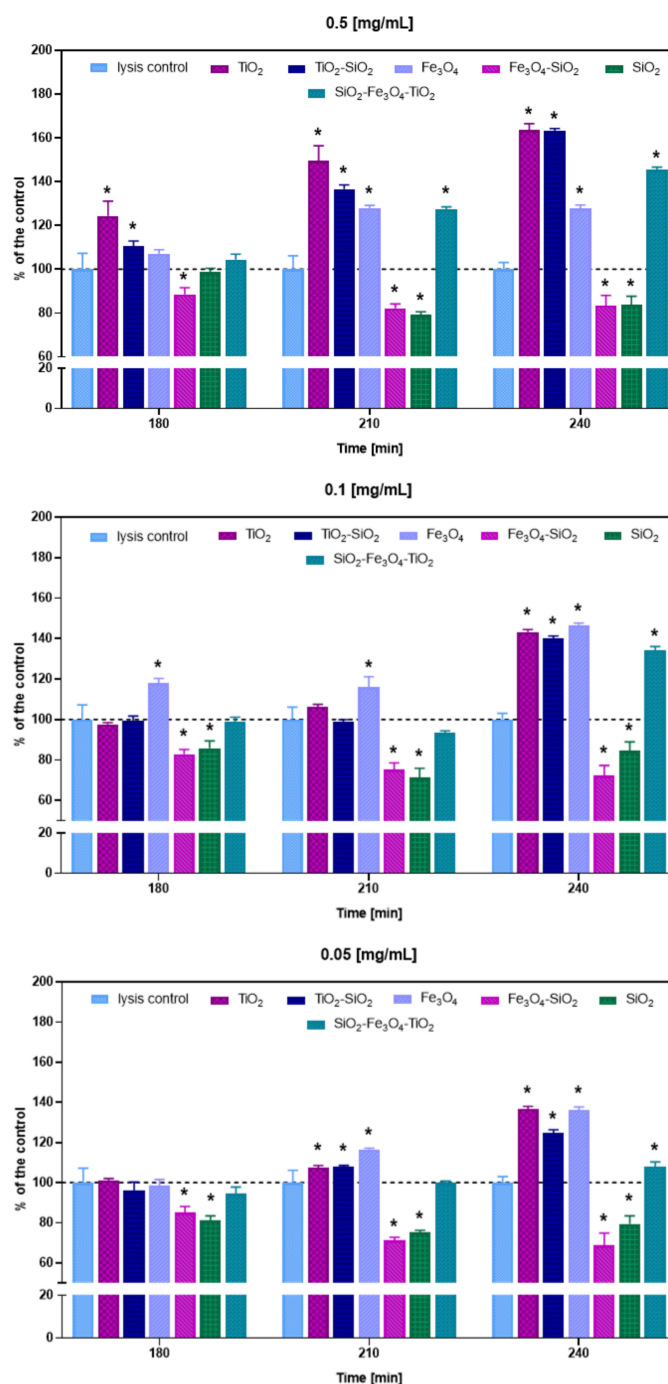


Figure 3. Area under the curve analysis of phage T4₅ infection in the presence of nanoparticles at different concentrations (0.5, 0.1 and 0.05 mg/mL), at 180, 210 and 240 min of infection, as derived from lysis profile experiments equivalent to those presented in Supplementary Material (Figure S3). The smaller the area under a lysis profile curve, the greater the reductions in culture turbidity over time—better phage lysis performance. Percent above the dashed lines indicate higher optical density (OD) drops/greater reductions in culture turbidity compared to the control/better phage lysis. Percent below the dashed lines indicate lower OD drops/smaller reductions in culture turbidity compared to the control/weaker phage lysis. Error bars represent standard deviation between samples. Means sharing the star asterisk are significantly different from each other at $p \leq 0.05$.

The quickest and most significant changes in phage lytic activity were observed at the highest (0.5 mg/mL) concentration of nanoparticles, and the highest percentage values occurred at 240 min of incubation. Compared to the lysis control, the presence of TiO₂ resulted in increased lytic performance by 24%, 50% and 64% at 180, 210 and 240 min, respectively. Similarly, TiO₂-SiO₂ presence resulted in improved lytic performance by 10%, 37% and 63% at 180, 210 and 240 min, respectively. A significant improvement in T4₅ lysis ability was also noted when Fe₃O₄ was added, but only at 210 and 240 min after phage infection, by 28%. Comparable results were observed for SiO₂-Fe₃O₄-TiO₂, where in the presence of the nanoparticles, phage lytic performance increased by 27% and 45% at 210 and 240 min, respectively. At a concentration of 0.5 mg/mL, reductions in phage lytic activity were also noted. This was the case with Fe₃O₄-SiO₂ nanoparticles (decreased by 11%, 18%, 17% at 180, 210, 240 min, respectively) and SiO₂ nanoparticles (decreased by 21% and 16% at 210 and 240 min, respectively).

At 0.1 mg/mL and 0.05 mg/mL, the greatest changes in percentage values occurred also at 240 min of incubation, but significant changes in reductive values were also detected earlier, at 180 and 210 min, whereas additive effects were present mostly at 210 and 240 min. At a concentration of 0.1 mg/mL, a significant improvement in T4₅ lysis ability was noted for Fe₃O₄, which increased phage performance by 18%, 16% and 47% at 180, 210 and 240 min, respectively. Significant lysis improvement was also detected for TiO₂ (43%), TiO₂-SiO₂ (40%) and SiO₂-Fe₃O₄-TiO₂ (34%) at 240 min after phage infection. Reductions in phage lytic activity were recorded for Fe₃O₄-SiO₂ and SiO₂, and were similar to those at 0.5 mg/mL (Fe₃O₄-SiO₂: decreased by 17%, 25%, 28% at 180, 210, 240 min, respectively; SiO₂: decreased by 14%, 29%, 15% at 180, 210, 240 min, respectively).

The reductions at a concentration of 0.05 mg/mL were also detected for the same nanoparticles and similar to those mentioned before (Fe₃O₄-SiO₂: decreased by 15%, 29%, 31% at 180, 210, 240 min, respectively; SiO₂: decreased by 19%, 25%, 21% at 180, 210, 240 min, respectively). A significant improvement in the phage lysis ability was detected only at 210 and 240 min of incubation. At 210 min, TiO₂, TiO₂-SiO₂ and Fe₃O₄ presence resulted in the phage lytic boost by 8%, 8% and 17%, respectively, and at 240 min, these values further increased to 37%, 25% and 36%, respectively. At 240 min, an improvement in phage lytic performance was also noted for SiO₂-Fe₃O₄-TiO₂ (8%) (Figure 3).

3.4. Phage Eclipse Periods after Nanoparticle Exposure

Phage T4₅ eclipse periods were tested in order to assess the time between infection and the appearance of phage progeny within the cell (intracellular phage/total phage) in the presence of nanoparticles. Independently to the used nanoparticle concentration, the presence of most of them resulted in a quicker and greater production of phage particle progeny from bacterial cells, compared to the control, just after 12 min of incubation (Figure 4). The highest concentration (0.5 mg/mL) of all tested nanoparticles, namely Fe₃O₄-SiO₂, SiO₂-Fe₃O₄-TiO₂, TiO₂-SiO₂, SiO₂, TiO₂ and Fe₃O₄, resulted in a significant increase in phage progeny numbers of 2.79×10^7 (PFU/mL), 1.91×10^7 (PFU/mL), 2.06×10^7 (PFU/mL), 2.22×10^7 (PFU/mL), 1.59×10^7 (PFU/mL) and 1.7×10^7 (PFU/mL) after 16 min of incubation compared to the control, respectively. At a concentration of 0.1 mg/mL, the presence of SiO₂-Fe₃O₄-TiO₂, TiO₂-SiO₂, SiO₂, TiO₂ and Fe₃O₄ resulted in the phage progeny numbers of 1.24×10^7 (PFU/mL), 1.99×10^7 (PFU/mL), 2.84×10^7 (PFU/mL), 2.29×10^7 (PFU/mL) and 0.92×10^7 (PFU/mL) after 16 min of incubation compared to the control, respectively. That time, only Fe₃O₄-SiO₂ presence did not alter the phage progeny numbers significantly (2.76×10^6 PFU/mL; control— 1.56×10^6 PFU/mL). The lowest nanoparticle concentration (0.05 mg/mL) of Fe₃O₄-SiO₂, SiO₂-Fe₃O₄-TiO₂, TiO₂-SiO₂, SiO₂, TiO₂ and Fe₃O₄ resulted in the phage progeny numbers of 3.37×10^7 (PFU/mL), 1.86×10^7 (PFU/mL), 2.06×10^7 (PFU/mL), 2.52×10^7 (PFU/mL), 2.1×10^7 (PFU/mL) and 1.94×10^7 (PFU/mL) after 16 min of incubation compared to the control, respectively (Figure 4). More detailed statistical analysis of the results of progeny phage numbers can be found in the Supplementary Material (Table S1).

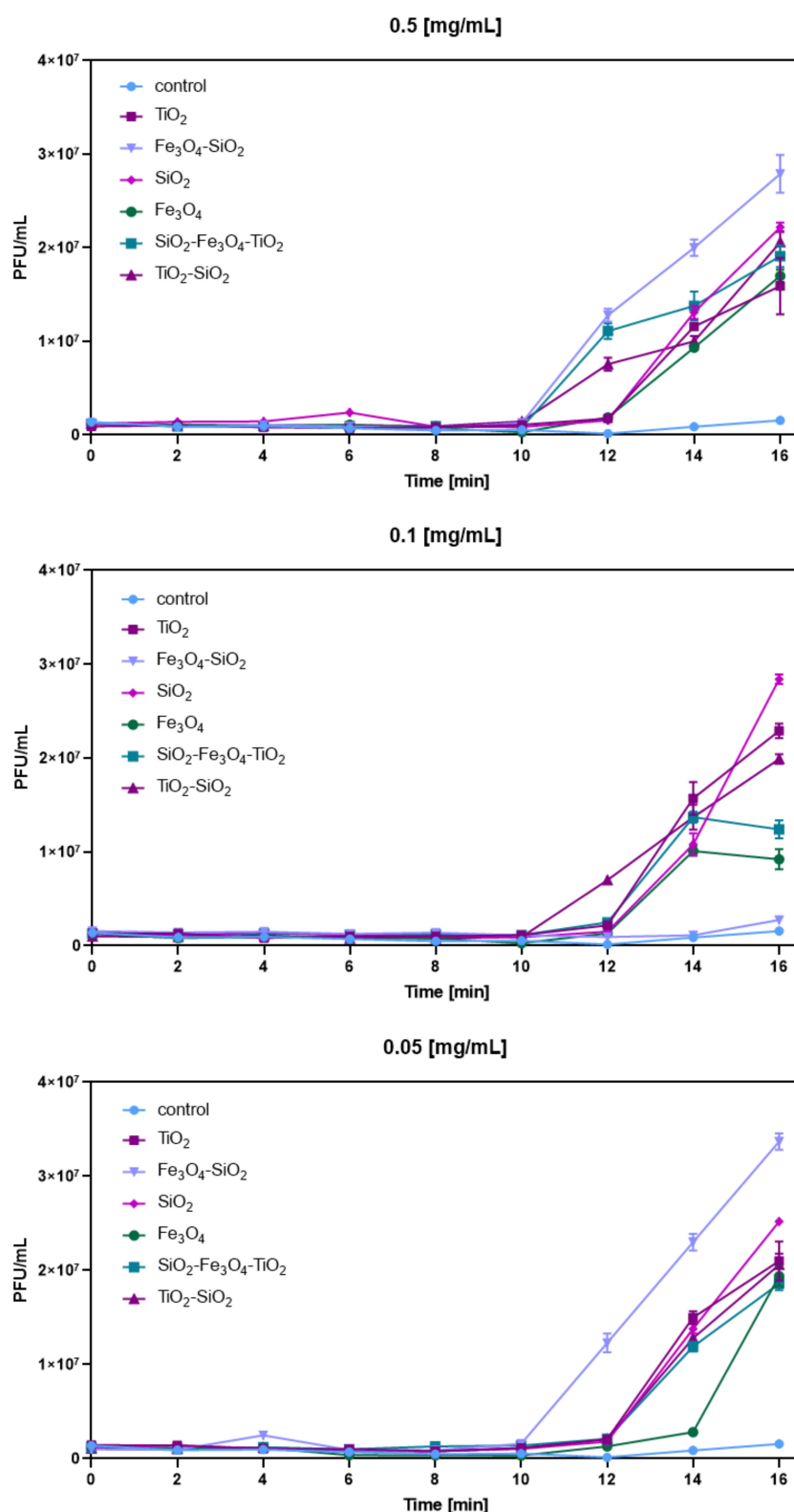


Figure 4. Bacteriophage T45 eclipse periods in the presence of selected nanoparticles At concentrations of 0.5 mg/mL, 0.1 mg/mL and 0.05 mg/mL.

3.5. Visualization of Phage–Nanoparticle Interaction

Coliphage T45 was subjected to TEM to determine phage morphology and confirm phage classification that was assumed from our previous experiments. TEM images of the phage T45 (Figure 5a,a') resulted in classification of the virus into the *Caudovirales* order and

the *Myoviridae* family, based on the typical phage morphological and infection features [43]. The images revealed that phages were in close proximity or in direct contact with nanoparticles. T4₅ with SiO₂ showed phages bound to silica spheres by their tails (Figure 5b,b'), in line with knowledge on the charge differences based on zeta potential (Table 1). Therefore, electrostatic interaction between phage and silica nanoparticles occurred. Negatively charged silica surfaces bind with positively charged phage tails. When silica spheres were coated with titanium nanoparticles (TiO₂-SiO₂), nonspecific phage binding happened, irrespective of the overall negative charge in the nanoparticles (Table 1)—phage particles were attached by their negatively charged heads (Figure 5c), as well as their positively charged tails (Figure 5c'). Phage T4₅ in the presence of titanium dioxide attached to the positively charged TiO₂ particles (Table 1) by the negatively charged head (Figure 5d,d'). When phage was in contact with Fe₃O₄ nanoparticles, the phage was again attached nonspecifically to the nanomaterial with close to neutral overall charge (Figure 5e,e', Table 1). The presence of the negatively charged complex nanomaterial (SiO₂-Fe₃O₄-TiO₂) resulted in varied phage binding, with the predominance of phage flow in the direction of the nanoparticles (Figure 5f,f'). Fe₃O₄ nanoparticles covered by porous silica (Fe₃O₄-SiO₂) with an overall negative charge were attached to the tail of the phage (Figure 5g). Additional images showing phage T4₅ and nanoparticle interactions are presented in the Supplementary Material (Figure S4).

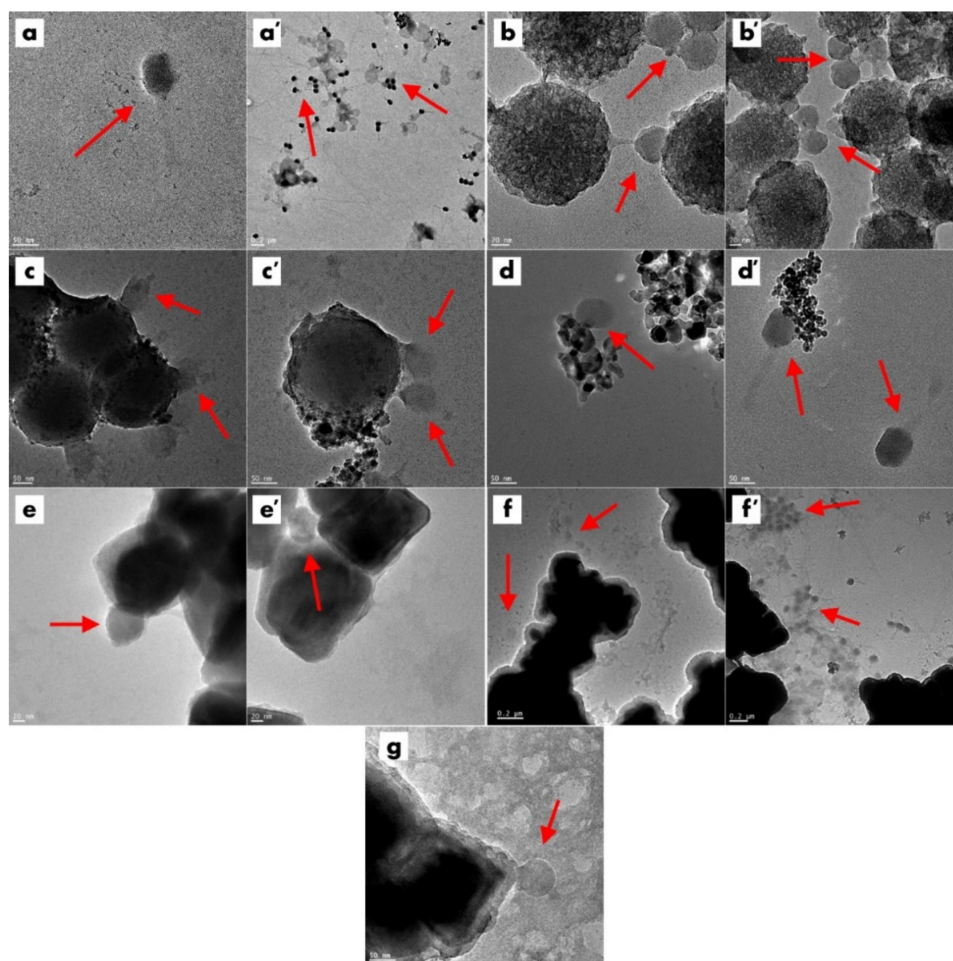


Figure 5. TEM micrographs of bacteriophage T4₅ (a,a') and of phage–nanoparticle interactions (b–g). Red arrows point to the phage particles. SiO₂ and phage (b,b'), TiO₂-SiO₂ and phage (c,c'), TiO₂ and phage (d,d'), Fe₃O₄ and phage (e,e'), SiO₂-Fe₃O₄-TiO₂ and phage (f,f'), Fe₃O₄-SiO₂ and phage (g).

4. Discussion

With regard to phage–nanoparticle interactions, most of the work to date has focused on designing novel, functional materials or composites. The most common approach is using phages as scaffolds, nanocomposites or templates with nanoparticle addition. These are characterized as bioinorganic nanohybrids, composed of biological macromolecules and functional inorganic nanomaterials [44]. Since nanoscale inorganic materials are challenging in assembling into defined structures, the use of self-ordered biomolecules directly obtained from nature (nucleic acids, proteins, viruses) to organize nanomaterials into predesigned patterns is proposed. Bacteriophage–gold nanoparticle hybrids using phage M13 are one example [44]. The M13 phage is also mainly used for the phage display method—the process of identifying specific biological binding blocks using phage–bacteria biology through a directed evolution process—and the phage can recognize desired materials at the molecular level due to the recognition peptides [45]. An example of the use of phage display incorporating nanoparticles is the work of You et al. [46], in which two peptides were selected from a phage display peptide library by using ferromagnetic NPs as targets, since the selected peptides were verified to display strong binding affinity to Fe₃O₄ NPs.

Another phage–nanoparticle combination approach is designing biosensors, which is often combined with phage display technology. Peng et al. [47] engineered phage M13 to display the receptor-binding protein that targets the desired bacteria and then thiolated the phages, which allowed the binding of gold nanoparticles that aggregated on the phages, resulting in a visible color change. Similarly, Souza et al. [48] fabricated “spontaneous, biologically active molecular networks” of filamentous phage and gold nanoparticles, working as biological sensors and cell-targeting agents, using peptide-displaying technology. With regard to designing bioactive surfaces with phages, physisorption by electrostatic forces and covalent bonding are most frequently used [34]. While covalent attachment offers a strong bond and phage detachment is not easy, it requires appropriate chemicals and rather complicated methodology [34,49]. A much simpler immobilization strategy uses the physical adsorption of the phage by electrostatic attraction between the phage and the surface [50].

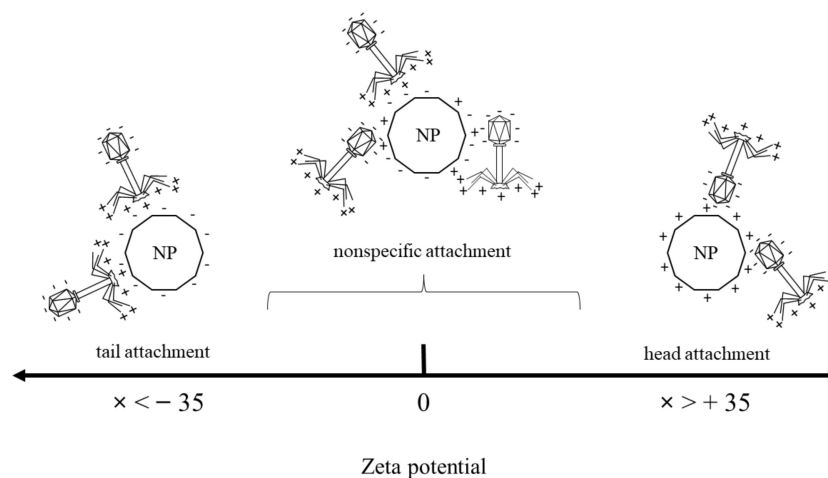
However, little is known about interactions of non-filamentous lytic phages (especially of *Myoviridae* morphology) and free, non-ordered nanoparticles. This knowledge could be particularly useful for designing simple bio-sanitization solutions (co-application) or even prediction of phage and nanoparticle possible contact effects in the environment (potential influence of nanoparticles on phage lytic activity). Therefore, in our study, to understand the mechanisms of these phage–nanoparticle interactions, T4-like phage (T4₅) was used as a model. T4-like phages (similarly as bacteriophage T4) have a complex head–tail structure that is characteristic of over 95% of all known bacteriophages. The *Myoviridae* phage consists of more than 40 different types of structural proteins which, simplifying, form a head and a contractile tail ending in a basal plate with six tail fibers. Almost half of these proteins are exposed to the external environment, with most of them being negatively charged at a pH of ~ 7 (their isoelectric point is pI < 7), except for the fiber ends, where the pI is > 7. Positively charged fibers are electrostatically attracted by bacteria that have a negatively charged surface [51]. Nanoparticles that were chosen for this study (SiO₂, TiO₂-SiO₂, TiO₂, Fe₃O₄, Fe₃O₄-SiO₂ and SiO₂-Fe₃O₄-TiO₂) were characterized with different properties (Section 3.1, Nanomaterial Characterization) to ensure diversity in possible observed interactions. Nanomaterials were tested at the relatively low concentrations of 0.5, 0.1 and 0.05 mg/mL, since the concentrations of nanoparticles in the environment are unlikely to reach higher values [52]. A number of experiments were performed to determine: nanoparticle zeta potentials, phage plaque-forming ability after coinubation with nanoparticles and phage lytic performance in the presence of nanoparticles. Phage progeny boost times and titers were also determined by the eclipse phase determinations along with TEM micrographs of the interactions. Microscopic analysis of the tested samples showcased phage–nanoparticle physical attachments (Table 2).

Table 2. Key concentrated results of the present study, based on all of the obtained results.

Nanomaterial	Concentration [mg/mL]	Zeta Potential [mV]	Phage Plaque-Forming Ability at t = 0 h	Phage Plaque-Forming Ability at t = 60 h	Phage Lytic Performance after 240 min	Phage Progeny Boost Time	Phage Progeny Titer [PFU/mL]	Phage Attachment
SiO ₂	0.5	−51 ± 0.3	Visibly reduced	Visibly reduced	Decreased	From 12 min	2.22 × 10 ⁷	Tail
	0.1		Partial	Partial	Decreased	From 12 min	2.84 × 10 ⁷	
	0.05		Partial	Full	Decreased	From 12 min	2.52 × 10 ⁷	
SiO ₂ -TiO ₂	0.5	−25 ± 0.4	Full	Visibly reduced	Increased	From 10 min	2.06 × 10 ⁷	Nonspecific
	0.1		Full	Partial	Increased	From 10 min	1.99 × 10 ⁷	
	0.05		Full	Full	Increased	From 12 min	2.06 × 10 ⁷	
TiO ₂	0.5	36.5 ± 6	Full	Full	Increased	From 12 min	1.59 × 10 ⁷	Head
	0.1		Partial	Full	Increased	From 12 min	2.29 × 10 ⁷	
	0.05		Visibly reduced	Partial	Increased	From 12 min	2.1 × 10 ⁷	
Fe ₃ O ₄	0.5	−1.1 ± 1	Partial	Full	Increased	From 12 min	1.7 × 10 ⁷	Nonspecific
	0.1		Partial	Full	Increased	From 12 min	9.22 × 10 ⁶	
	0.05		Partial	Full	Increased	From 14 min	1.94 × 10 ⁷	
Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	0.5	−37.6 ± 0.6	Partial	Full	Decreased	From 10 min	2.79 × 10 ⁷	Tail
	0.1		Partial	Full	Decreased	After 16 min	2.76 × 10 ⁶	
	0.05		Partial	Full	Decreased	From 10 min	3.37 × 10 ⁷	
Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -TiO ₂	0.5	−19.5 ± 0.2	Partial	Full	Increased	From 10 min	1.91 × 10 ⁷	Nonspecific
	0.1		Full	Full	Increased	From 12 min	1.24 × 10 ⁷	
	0.05		Full	Full	Increased	From 12 min	1.86 × 10 ⁷	

In this study, nanoparticle zeta potential (ZP) values along with electron microscopy images were crucial to explain the rest of the results. Since the overall ZP value for T4 phage is close to neutral (-1.1 ± 0.49 mV) [53], the results were interpreted based on the distribution of phage charges (negatively charged phage head and positively charged tail) [54].

Our results are interpreted with caution; however, it can be hypothesized that the mere presence of the nanoparticle charge, negative or positive, is not enough for the phage to attach specifically to the particle and consequently influence the phage performance. The zeta potential value of the nanoparticle is of the greatest influence—particles with a ZP lower than -35 [mV] bind effectively with positively charged phage tails, whereas particles with a ZP higher than 35 [mV] bind effectively with negatively charged phage heads (Figure 6). This was also additionally proven for CNT-TiO₂ particles (Supplementary Material, Figure S5). When the particles do not meet these requirements, phage–nanoparticle physical interaction becomes nonspecific (Table 2).

**Figure 6.** Proposed graphic explanation of the phenomenon of the electrostatic attachment of the phage T4-like and the tested nanoparticles. NP—nanoparticle.

These are in agreement with previous studies, where Cademartiri et al. [55] reported that tailed *Myoviridae* and *Siphoviridae* phages will effectively physisorb to porous silica spheres, rendered cationic or anionic by surface modification. Phage did not adsorb effec-

tively to surfaces modified with neutral groups, and the number of infective phages bound to the silica was enhanced by the presence of ionic surfaces, with a greater surface charge correlating with greater concentration of adsorbed phages. The electrostatic attachment was also tested by Richter et al. [51], who engineered gold nanoparticles coated with a mixture of negatively charged 11-mercapto 1-undecanesulfonic acid (MUS) and hydrophobic 1-octanethiol (OT), which deactivated various types of *Escherichia coli*-selective phages: T1, T4 and T7. Moreover, the importance of the electrostatic forces was confirmed, since non-charged nanoparticles showed no effect in all analyzed cases. Thus, it was confirmed that the interactions between phages and nanoparticles can be predicted on the basis of the electrostatic forces between the averaged charges of phage proteins (represented by their pI) and the charges of nanoparticles [51]. We observed decreased phage lytic performance in the combination with SiO₂ (ZP = -51 ± 0.3 [mV]) and Fe₃O₄-SiO₂ (ZP = -37.6 ± 0.6 [mV]), which, as proposed by Khan et al. [56], is caused by the tail fiber target binding of the T4 phage; hence, the adsorption of the tail to a substrate (here, nanoparticles) limits the ability of T4 to bind targets (bacteria).

Tested nanoparticle concentrations had a minor influence on the phage–nanoparticle interactions, except for phage plaque-forming ability after coincubation with nanomaterials, and, only a slight influence on phage progeny boost time during the eclipse phase (± 2 min) (Table 2). After coincubation, the phage was removed from the nanoparticle environment and, hence, the acquired phages could be the ones that: did not attach to the particles (small nanoparticles concentration/low availability), were left in the particle sediment after attachment, detached due to the small ZP value ($t = 60$ min) or did not have enough time to attach ($t = 0$ min). Moreover, it has been shown that even if the nanoparticles have a negative effect on phage lysis, when phage detaches, no permanent structural changes are incurred that produce inhibitory effects on infection after nanoparticles are removed [57]. Similarly, Khan et al. [56] noted that, contrary to predictions based on the charge differential for T4, the retention of activity was seen not only for phages adsorbed to cationic particles, but also for those bound to anionic spheres.

Similar to the present work, Gilcrease et al. [57] also tested whether bacteriophage lytic growth cycle is affected by the presence of nanoparticles, using silver nanoparticles with coating materials. One-step growth curves of bacteriophages showed that the presence of these nanoparticles resulted in 96% reductions in phages PFUs. However, when tailed *Siphoviridae* and *Myoviridae* phages were exposed to silver nanoparticles coated with poly-N-vinyl-2 pyrrolidone (PVP), final phage yield increased by 250%, compared with the same phage not incubated with nanoparticles. However, researchers suggest that this phenomenon is due to the coating itself, but the mechanism of phage stimulation by PVP was not revealed. In our results, we observed the cases of phage and negatively charged nanoparticles, in which eclipse periods showed quick phage progeny boost and titer, with a simultaneous decrease in phage lytic activity and phage tail binding (SiO₂ and Fe₃O₄-SiO₂). It can be hypothesized that after the first phage progeny burst, the phage particles are gradually captured over time by the negatively charged nanoparticles; hence, with each infective cycle, the amount of phage available to the bacteria decreases. In the cases where we noted increased lytic activity of the phage along with head binding to the positively charged nanoparticles (TiO₂) or nonspecific phage binding (SiO₂-TiO₂, Fe₃O₄ and Fe₃O₄-SiO₂-TiO₂), it can be hypothesized that phage T4₅ and nanoparticles worked in synergy. Similarly, You et al. [9] observed that 1 h prior exposure to silver and zinc oxide nanoparticles did not inactivate the MS2 phage at the highest nanoparticle concentrations tested (5 mg/L total Ag and 20 mg/L ZnO), but in a complex system where the *E. coli* was exposed to MS2 and nanoparticles simultaneously, the number of phages increased by 2–6 orders of magnitude.

A single T4-like phage virion is a colloidal particle, often having a dipole moment [7]. Therefore, it can be successfully bound to various nanomaterials with an appropriate (measurable) electric charge and increase or decrease the antimicrobial activity in the phage. For this reason, phages can be used not only in effective phage therapy, but also in

biocontrol applications, e.g., in the food industry and agriculture, to protect dairy products, fruits, vegetables, meat and fish [7]. It should be noted, however, that the development of future disinfection solutions based on bacteriophages and nanoparticles may be hampered by the instability of phage and nanoparticle physical attachments, which could potentially be solved by the use of nanoparticles with, preferably, high zeta potentials.

5. Conclusions

In this paper, the interactions of six different nanoparticles and T4-like phages were revealed. Decreased phage lytic performance in the presence of nanoparticles having a ZP < −35 [mV] was observed. Particles with a low ZP cause the phage to attach with its tail fibers; hence, the adsorption of the phage tail to nanoparticle limits the ability of the phage to bind targets (bacteria). However, in some cases, retention of phage activity (plaque-forming ability) has been shown when the phage detached from the nanoparticle and was removed from the nanoparticle environment. No permanent changes were incurred that produced inhibitory effects on later phage infection. Increased phage lytic activity in the presence of nanoparticles was also noted. This was the case when the phage attached to the positively charged nanoparticles by the head, and when nonspecific phage binding took place, which could indicate antibacterial phage–nanoparticle synergy. However, generally, our results concerning nano–phage–bacteria mixtures are interpreted with caution, due to the probability of occurrence of some additional bacteria–nanoparticle interactions.

Overall, it was established that the mere presence of the nanoparticle charge is not sufficient for specific phage binding to a nanoparticle. The greatest influence in phage–nanoparticle interactions is the zeta potential (ZP) value of the nanoparticle. It was demonstrated that particles with a ZP lower than −35 (mV) bind effectively with positively charged phage tails, and particles with a ZP higher than 35 (mV) bind effectively with negatively charged phage heads. Particles which do not meet these requirements cause phage–nanoparticle physical interaction to become nonspecific. In consequence, interactions between phages and nanoparticles can be predicted on the basis of the particle charges expressed in ZP values.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23137179/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, X.S., K.C. and P.N.; methodology, X.S., K.C. and P.N.; validation, X.S., K.C. and P.N.; formal analysis, X.S.; investigation, X.S., K.C. and A.P.; resources, X.S., K.C., K.P., A.P., E.M. and P.N.; data curation, X.S., K.C. and A.P.; writing—original draft preparation, X.S., K.C. and P.N.; writing—review and editing, X.S., K.C., K.P., A.P., E.M. and P.N.; visualization, X.S. and K.C.; supervision, E.M. and P.N.; project administration, K.P.; funding acquisition, K.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the National Science Centre, Poland, within the PRELUDIUM Program, grant number 2017/25/N/ST5/01222.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References




1. Sunderland, K.S.; Yang, M.; Mao, C. Phage-Enabled Nanomedicine: From Probes to Therapeutics in Precision Medicine. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 1964–1992. [[CrossRef](#)]
2. Abedon, S.T.; García, P.; Mullany, P.; Aminov, R. Editorial: Phage Therapy: Past, Present and Future. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 981. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Stachurska, X.; Roszak, M.; Jabłońska, J.; Mizielińska, M.; Nawrotek, P. Double-Layer Agar (DLA) Modifications for the First Step of the Phage–Antibiotic Synergy (PAS) Identification. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Chan, B.K.; Abedon, S.T.; Loc-Carrillo, C. Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiol.* **2013**, *8*, 769–783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Hatfull, G.F. Bacteriophage genomics. *Curr. Opin. Microbiol.* **2008**, *5*, 447–453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Hendrix, R.W.; Hatfull, G.F.; Smith, M.C. Bacteriophages with tails: Chasing their origins and evolution. *Res. Microbiol.* **2003**, *154*, 253–257. [[CrossRef](#)]
7. Paczesny, J.; Bielec, K. Application of Bacteriophages in Nanotechnology. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1944. [[CrossRef](#)]
8. Nawrotek, P.; Stachurska, X.; Augustyniak, A. Perspektywiczne możliwości wykorzystania kombinacji działania bakteriofagów i nanomateriałów w zwalczaniu chorób bakteryjnych u zwierząt. *Med. Weter.* **2020**, *76*, 375–381. [[CrossRef](#)]
9. You, J.; Zhang, Y.; Hu, Z. Bacteria and bacteriophage inactivation by silver and zinc oxide nanoparticles. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2011**, *85*, 161–167. [[CrossRef](#)]
10. Stark, W.J. Nanoparticles in Biological Systems. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1242–1258. [[CrossRef](#)]
11. Petros, R.A.; DeSimone, J.M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 615–627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Lewinski, N.; Colvin, V.; Drezek, R. Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small* **2008**, *4*, 26–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ravishanker, R.V.; Jamuna, B.A. Nanoparticles and their potential application as antimicrobials. In *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*; Méndez-Vilas, A., Ed.; Microbiology Series No. 3; Formatex: Badajoz, Spain, 2011; Volume 1, p. 197.
14. Dizaj, S.M.; Lotfipour, F.; Barzegar-Jalali, M.; Zarrintan, M.H.; Adibkia, K. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *44*, 278–284. [[CrossRef](#)]
15. Salata, O.C. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J. Nanobiotechnology* **2004**, *2*, 3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Khan, I.; Saeed, K.; Khan, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab. J. Chem.* **2019**, *12*, 908–931. [[CrossRef](#)]
17. Khan, R.H.; Ahmad, E.; Zaman, M.; Qadeer, A.; Rabbani, G. Nanoparticles in relation to peptide and protein aggregation. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 899–912. [[CrossRef](#)]
18. Hajipour, M.J.; Fromm, K.M.; Ashkarran, A.A.; de Aberasturi, D.J.; de Larramendi, I.R.; Rojo, T.; Serpooshan, V.; Parak, W.J.; Mahmoudi, M. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 499–511. [[CrossRef](#)]
19. Moritz, M.; Geszke-Moritz, M. The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. *Chem. Eng. J.* **2013**, *228*, 596–613. [[CrossRef](#)]
20. Zhao, Y.; Chen, Z.; Chen, Y.; Xu, J.; Li, J.; Jiang, X. Synergy of Non-antibiotic Drugs and Pyrimidinethiol on Gold Nanoparticles against Superbugs. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12940–12943. [[CrossRef](#)]
21. Comeau, A.M.; Tétart, F.; Trojet, S.N.; Prère, M.-F.; Krisch, H.M. Phage–Antibiotic Synergy (PAS): β -Lactam and Quinolone Antibiotics Stimulate Virulent Phage Growth. *PLoS ONE* **2007**, *2*, e799. [[CrossRef](#)]
22. Karimi, M.; Mirshekari, H.; Basri, S.M.M.; Bahrami, S.; Moghoofei, M.; Hamblin, M.R. Bacteriophages and phage-inspired nanocarriers for targeted delivery of therapeutic cargos. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *106*, 45–62. [[CrossRef](#)]
23. Scibilia, S.; Lentini, G.; Fazio, E.; Franco, D.; Neri, F.; Mezzasalma, A.M.; Guglielmino, S.P.P. Self-assembly of silver nanoparticles and bacteriophage. *Sens. Bio-Sens. Res.* **2016**, *7*, 146–152. [[CrossRef](#)]
24. Kaikabo, A.A.; Mohammed, A.S.; Abas, F. Chitosan Nanoparticles as Carriers for the Delivery of Φ KAZ14 Bacteriophage for Oral Biological Control of Colibacillosis in Chickens. *Molecules* **2016**, *21*, 256. [[CrossRef](#)]
25. Li, L.-L.; Yu, P.; Wang, X.; Yu, S.-S.; Mathieu, J.; Yu, H.-Q.; Alvarez, P.J.J. Enhanced biofilm penetration for microbial control by polyvalent phages conjugated with magnetic colloidal nanoparticle clusters (CNCs). *Environ. Sci. Nano* **2017**, *4*, 1817–1826. [[CrossRef](#)]
26. Segall, A.M.; Roach, D.R.; Strathdee, S.A. Stronger together? Perspectives on phage–antibiotic synergy in clinical applications of phage therapy. *Curr. Opin. Microbiol.* **2019**, *51*, 46–50. [[CrossRef](#)]
27. Tagliaferri, T.L.; Jansen, M.; Horz, H.-P. Fighting Pathogenic Bacteria on Two Fronts: Phages and Antibiotics as Combined Strategy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2019**, *9*, 22. [[CrossRef](#)]
28. Akturk, E.; Oliveira, H.; Santos, S.B.; Costa, S.; Kuyumcu, S.; Melo, L.D.R.; Azeredo, J. Synergistic Action of Phage and Antibiotics: Parameters to Enhance the Killing Efficacy against Mono and Dual-Species Biofilms. *Antibiotics* **2019**, *8*, 103. [[CrossRef](#)]
29. Mangalea, M.R.; Duerkop, B.A. Fitness Trade-Offs Resulting from Bacteriophage Resistance Potentiate Synergistic Antibacterial Strategies. *Infect. Immun.* **2020**, *88*, e00926-19. [[CrossRef](#)]
30. Zhang, Q.-G.; Buckling, A. Phages limit the evolution of bacterial antibiotic resistance in experimental microcosms. *Evol. Appl.* **2012**, *5*, 575–582. [[CrossRef](#)]
31. Dickey, J.; Perrot, V. Adjunct phage treatment enhances the effectiveness of low antibiotic concentration against *Staphylococcus aureus* biofilms in vitro. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0209390. [[CrossRef](#)]
32. Jo, A.; Kim, J.; Ding, T.; Ahn, J. Role of phage–antibiotic combination in reducing antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Food Sci. Biotechnol.* **2016**, *25*, 1211–1215. [[CrossRef](#)]
33. Oechslin, F.; Piccardi, P.; Mancini, S.; Gabard, J.; Moreillon, P.; Entenza, J.M.; Resch, G.; Que, Y.-A. Synergistic interaction between phage therapy and antibiotics clears *Pseudomonas aeruginosa* infection in endocarditis and reduces virulence. *J. Infect. Dis.* **2017**, *215*, 703–712. [[CrossRef](#)]

34. Hosseinidoust, Z.; Olsson, A.L.; Tufenkji, N. Going viral: Designing bioactive surfaces with bacteriophage. *Colloids Surf. B* **2014**, *124*, 2–16. [[CrossRef](#)]
35. Appleyard, R.K. Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. *Genetics* **1954**, *39*, 440–452. [[CrossRef](#)]
36. Kropinski, A.M.; Mazzocco, A.; Waddell, T.E.; Lingohr, E.; Johnson, R.P. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. In *Bacteriophages. Methods in Molecular Biology*; Clokie, M.R., Kropinski, A.M., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2009; Volume 501, pp. 69–76.
37. Cendrowski, K.; Sikora, P.; Zielinska, B.; Horszczaruk, E.; Mijowska, E. Chemical and thermal stability of core-shelled magnetite nanoparticles and solid silica. *Appl. Surf. Sci.* **2017**, *407*, 391–397. [[CrossRef](#)]
38. Cendrowski, K. Titania/mesoporous silica nanotubes with efficient photocatalytic properties. *Pol. J. Chem. Technol.* **2018**, *20*, 103–108. [[CrossRef](#)]
39. Augustyniak, A.; Cendrowski, K.; Nawrotek, P.; Barylak, M.; Mijowska, E. Investigating the Interaction between *Streptomyces* sp. and Titania/Silica Nanospheres. *Water, Air, Soil Pollut.* **2016**, *227*, 230. [[CrossRef](#)]
40. Cendrowski, K.; Chen, X.; Zielinska, B.; Kalenczuk, R.J.; Rümmele, M.H.; Büchner, B.; Klingeler, R.; Borowiak-Palen, E. Synthesis, characterization, and photocatalytic properties of core/shell mesoporous silica nanospheres supporting nanocrystalline titania. *J. Nanoparticle Res.* **2011**, *13*, 5899–5908. [[CrossRef](#)]
41. Cendrowski, K.; Kukułka, W.; Wierzbicka, J.; Mijowska, E. The river water influence on cationic and anionic dyes collection by nickel foam with carbonized metal-organic frameworks and carbon nanotubes. *J. Alloy. Compd.* **2021**, *876*, 160093. [[CrossRef](#)]
42. Cendrowski, K.; Peruzynska, M.; Markowska-Szczupak, A.; Chen, X.; Wajda, A.; Lapczuk, J.; Kurzawski, M.; Kalenczuk, R.J.; Drozdziak, M.; Mijowska, E. Mesoporous Silica Nanospheres Functionalized by TiO₂ as a Photoactive Antibacterial Agent. *J. Nanomed. Nanotechnol.* **2013**, *4*, 182. [[CrossRef](#)]
43. Ackermann, H.W. Phage classification and characterization. In *Bacteriophages. Methods in Molecular Biology*; Clokie, M.R., Kropinski, A.M., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2009; Volume 501, pp. 127–140.
44. Cao, B.; Xu, H.; Mao, C. Transmission electron microscopy as a tool to image bioinorganic nanohybrids: The case of phage-gold nanocomposites. *Microsc. Res. Tech.* **2011**, *74*, 627–635. [[CrossRef](#)]
45. Merzlyak, A.; Lee, S.-W. Phage as templates for hybrid materials and mediators for nanomaterial synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 246–252. [[CrossRef](#)]
46. You, F.; Yin, G.; Pu, X.; Li, Y.; Hu, Y.; Huang, Z.; Liao, X.; Yao, Y.; Chen, X. Biopanning and characterization of peptides with Fe₃O₄ nanoparticles-binding capability via phage display random peptide library technique. *Colloids Surf. B* **2016**, *141*, 537–545. [[CrossRef](#)]
47. Peng, H.; Chen, I.A. Rapid Colorimetric Detection of Bacterial Species through the Capture of Gold Nanoparticles by Chimeric Phages. *ACS Nano* **2018**, *13*, 1244–1252. [[CrossRef](#)]
48. Souza, G.R.; Christianson, D.R.; Staquicini, F.I.; Ozawa, M.G.; Snyder, E.Y.; Sidman, R.L.; Miller, J.H.; Arap, W.; Pasqualini, R. Networks of gold nanoparticles and bacteriophage as biological sensors and cell-targeting agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 1215–1220. [[CrossRef](#)]
49. Handa, H.; Gurczynski, S.; Jackson, M.P.; Auner, G.; Walker, J.; Mao, G. Recognition of *Salmonella typhimurium* by immobilized phage P22 monolayers. *Surf. Sci.* **2008**, *602*, 1392–1400. [[CrossRef](#)]
50. Balasubramanian, S.; Sorokulova, I.B.; Vodyanoy, V.J.; Simonian, A.L. Lytic phage as a specific and selective probe for detection of *Staphylococcus aureus*—A surface plasmon resonance spectroscopic study. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 948–955. [[CrossRef](#)]
51. Richter, L.; Paszkowska, K.; Cendrowska, U.; Olgiati, F.; Silva, P.J.; Gasbarri, M.; Guven, Z.P.; Paczesny, J.; Stellacci, F. Broad-spectrum nanoparticles against bacteriophage infections. *Nanoscale* **2021**, *13*, 18684–18694. [[CrossRef](#)]
52. Gottschalk, F.; Sun, T.; Nowack, B. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: Review of modeling and analytical studies. *Environ. Pollut.* **2013**, *181*, 287–300. [[CrossRef](#)]
53. Grygorcewicz, B.; Rakoczy, R.; Roszak, M.; Konopacki, M.; Kordas, M.; Piegat, A.; Serwin, N.; Cecerska-Heryć, E.; El Fray, M.; Dołęgowska, B. Rotating Magnetic Field-Assisted Reactor Enhances Mechanisms of Phage Adsorption on Bacterial Cell Surface. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2022**, *44*, 1316–1325. [[CrossRef](#)]
54. Anany, H.; Chen, W.; Pelton, R.; Griffiths, M.W. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in Meat by Using Phages Immobilized on Modified Cellulose Membranes. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 6379–6387. [[CrossRef](#)]
55. Cademartiri, R.; Anany, H.; Gross, I.; Bhayania, R.; Griffiths, M.; Brook, M.A. Immobilization of bacteriophages on modified silica particles. *Biomaterials* **2010**, *31*, 1904–1910. [[CrossRef](#)]
56. Khan, M.F.; Dong, H.; Chen, Y.; Brook, M.A. Low Discrimination of Charged Silica Particles at T4 Phage Surfaces. *Biosens. J.* **2015**, *4*, 125. [[CrossRef](#)]
57. Gilcrease, E.; Williams, R.; Goel, R. Evaluating the effect of silver nanoparticles on bacteriophage lytic infection cycle—a mechanistic understanding. *Water Res.* **2020**, *181*, 115900. [[CrossRef](#)]

Article

Combinations of Echinacea (*Echinacea purpurea*) and Rue (*Ruta graveolens*) Plant Extracts with Lytic Phages: A Study on Interactions

Xymena Stachurska ^{1,*}, Małgorzata Mizielińska ², Magdalena Ordon ² and Paweł Nawrotek ¹

¹ Department of Microbiology and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Animal Husbandry, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Piastów Avenue 45, 70-311 Szczecin, Poland; pawel.nawrotek@zut.edu.pl

² Center of Bioimmobilisation and Innovative Packaging Materials, Faculty of Food Sciences and Fisheries, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Janickiego 35, 71-270 Szczecin, Poland; malgorzata.mizielinska@zut.edu.pl (M.M.); magdalena.labuda@zut.edu.pl (M.O.)

* Correspondence: xymena.stachurska@zut.edu.pl

Abstract: The use of combined biocontrol strategies to combat bacterial-related issues is an increasingly popular approach. Therefore, a novel investigation was performed, where interactions of lytic bacteriophages (MS2, T4 and phi6) and methanolic plant extracts (*Echinacea purpurea* (EP) and *Ruta graveolens* (RG)) in the bacterial environment have been examined to understand their application potential and limitations. Due to the complexity of these interactions, many up-to-date techniques were used (microdilution method, phage extract coinubation assay, static interactions synographs and dynamic growth profile experiments in a bioreactor). As a result of our study, antagonism interactions were observed: EP and RG extracts showed antiphage and bacterial stimulating activity. Effects caused by low extract concentrations on microorganisms depended on the species of phage and bacteria, while high concentrations suppressed bacterial lysis in general. Moreover, interactions observed in the static environment differed from those performed in a dynamic environment, showing the importance of performing multiple analyses when investigating such complex mixtures.

Keywords: bacteriophage; phi6; MS2; T4; *E. coli*; *P. syringae*; plant extract; *Echinacea purpurea*; *Ruta graveolens*



Citation: Stachurska, X.; Mizielińska, M.; Ordon, M.; Nawrotek, P. Combinations of Echinacea (*Echinacea purpurea*) and Rue (*Ruta graveolens*) Plant Extracts with Lytic Phages: A Study on Interactions. *Appl. Sci.* **2023**, *13*, 4575. <https://doi.org/10.3390/app13074575>

Academic Editors: Ana Carolina Gonçalves and Andreia Filipa Silvestre Duarte

Received: 11 March 2023
Revised: 28 March 2023
Accepted: 31 March 2023
Published: 4 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Herbal preparations, including those using plant extracts of echinacea (*Echinacea purpurea*) and rue (*Ruta graveolens*), are widely known and increasingly used due to their significant healing properties, although little is known about their mode of action [1,2]. *E. purpurea* is a perennial plant native to eastern North America that belongs to the *Asteraceae* family. The plant is widely known for its medicinal properties, being one of the most used medicinal plants for its immunostimulant properties. This plant species is considered a safe herbal medicine, thus, it is usually used through extracts of the dried aerial parts or roots. The most common phytochemicals in *E. purpurea* are alkamides, polysaccharides, lipoproteins, betaine, sesquiterpenes, polyacetylene, saponins and phenolic compounds, responsible for its biological properties [2]. In turn, *R. graveolens* is widely distributed in various geographical regions of Afro-Asian countries. This plant is cultivated as a decorative plant and is used in traditional medicine for treating many disorders. All parts of the plant contain the active compound, but they are mostly found in leaves [1]. *R. graveolens* represents plants of the *Rutaceae* family, which are a big repository of secondary metabolites responsible for their aroma (terpenes), pigmentation (quinones and tannins) and flavour (terpenes). The extracts of these plants are a mixture of various compounds, such as terpenoids and phenols, to which antiseptic, antifungal, antioxidant and antitumoral properties are attributed [3,4]. Particular importance is attached to such botanical extracts in relation to their antimicrobial effects against certain pathogenic bacteria, where it is uncertain whether

they have any other effects on select groups of microorganisms [5–7]. It is worth knowing the effects of such mechanisms of action, as combinations of naturally antimicrobial plant extracts with other active agents of similar effectiveness may be more effective than those used as individual therapies [7]. Antimicrobial agents that can potentially be combined with plant extracts to create more effective preparations include bacteriophages (phages), which are currently getting more popular. Phages are viruses specific to bacterial cells known for over hundred years, which can successfully supplement or even (in some cases) replace traditional methods of prevention and treatment of bacterial diseases, especially those caused by strains which are found to be resistant to routinely used antimicrobial drugs [8]. The biochemical complexity of the molecules that make up the phage virion, their diversified size (expressed in the nanometric scale), the electric charge and hydrophobicity make bacteriophages interact with other materials in various ways. Those include different types of interactions with stimulating or antimicrobial effects, e.g., by altering phage activity as a result of a synergistic or antagonistic effect [9,10]. It should also be remembered that inhibition of bacteriophage proliferation or “antiphage activity test” is a sensitive, rapid and low-cost prescreening test, which can be applied to reliably detect pharmacological activity [11]. Moreover, bacteriophages have significant advantages, such as easy handling and cultivating in standard laboratory media. Therefore the employment of phages is being also propose to serve as eukaryotic cell virus surrogates [12–14].

Therefore, in the current study, interplays between lytic bacteriophages and plant extracts of echinacea (*Echinacea purpurea*) and rue (*Ruta graveolens*) have been investigated for their possible interactions in the bacterial environment, including possible antagonistic effects. To the best of our knowledge, this is the first work describing such phenomena.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Hosts and Bacteriophages

Bacteriophages and their bacterial hosts were purchased from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; DSMZ). In this study, *Pseudomonas syringae* (DSM 21482) with phage phi6 (DSM 21518), *Escherichia coli* (DSM 5695) with phage MS2 (DSM 13767) and *Escherichia coli* (DSM 613) with phage T4 (DSM 4505) were used. Chosen lytic phages were selected based on their different features (Table 1).

Table 1. Bacteriophage characteristics.

Bacteriophage	Family	Size	Genome	Features
Phi6 (Φ6)	<i>Cystoviridae</i>	~80–100 nm	dsRNA	Enveloped (lipid membrane), medium size, no tail
MS2	<i>Leviviridae</i>	~23–28 nm	ssRNA	Non-enveloped, small size and genome, no tail
T4	<i>Myoviridae</i>	~120–200 nm/86–90 nm	dsDNA	Non-enveloped, relatively big, contractile tail

Bacterial revival and phage propagation were conducted similarly, as described previously [15]. All strains were stored in TSB (trypticase soy broth) medium (BioMaxima, Lublin, Poland) with 10% (vol/vol) glycerol at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. The bacteria were revived on Luria–Bertani (LB agar) (BioMaxima, Lublin, Poland) for bacterial plate stocks by streaking glycerol stocks onto agar plates (plate incubation: 24 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for *E. coli* strains; 48 h at $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ for *P. syringae* strains). For bacteriophage amplification, several colonies from bacterial plate stock were used to inoculate 50 mL of LB, and were incubated (as described above) with shaking (120 rpm) in an orbital rotating shaker (Shaker–Incubator ES-20, BioSan, Józefów, Poland) to reach $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.2$. Optical density values were measured using an Infinite 200 PRO NanoQuant microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland). Then, phage was added, and samples were further incubated until the lysis occurred. For MS2 and T4 lysate purification, chloroform was added (10%, vol/vol) and the samples were

vortexed for 5 min, and then centrifuged (Eppendorf Centrifuge model 5810 R, Hamburg, Germany) at 5000 rpm for 25 min at 4 °C. The supernatant was collected immediately. For phi6 lysate purification, samples were firstly centrifuged (5000 rpm, 15 min, 4 °C) and then sterilized by filtration (PES filter, 0.22 µm). Lysates were stored at 4 °C for further use. Phage activity and titres were tested by a double-overlay agar plaque assay [16].

2.2. Plant Extract Preparation

Preparation of herb extracts following the methanol extraction method was carried out as proposed in our previous work [17,18], with some modifications. Of the dried herbs (aerial parts of *Echinacea purpurea* (L.) Moench and *Ruta graveolens*; Flos, Mokrsko, Poland), 50 g was placed in the glass bottle and 70% aqueous methanol (MeOH) was added to obtain 100 mL volume. Next, the samples were placed in a shaker (Ika, Staufen im Breisgau, Germany) and extracted for 2 h at 70 °C with 150 rpm. The crude methanol extracts were filtered through a Büchner funnel, equipped with a cellulose filter. The extracts were then concentrated by evaporation at 50 °C to obtain aqueous solutions. After the evaporation of methanol, the samples were filter-sterilized (PES, 0.22 µm) and then used for further experiments. In order to maintain a relatively low viscosity (the viscosity of the extracts was 16 s) to prevent the later formation of cell agglomerates in the samples (uneven distribution), the solutions were not concentrated any more. At this stage, the *Echinacea purpurea* extract was marked as “EP” and the *Ruta graveolens* extract as “RG”. Additionally, the dry mass of each extract was determined via a moisture analyser (Radwag, Puszczkowo, Poland). For the following experiments, different stock solutions (two-fold serial dilutions) of the extracts were diluted in sterile, deionized water, and kept at –20 °C until further analysis.

2.3. Plant Extract Studies on Bacterial Cells

To analyse the influence of plant extracts on bacteria, a 96-well microplate dilution protocol was carried out. For the microplate method, modified minimal inhibitory concentration (MIC) determination was used [19]. Several colonies from bacterial plates were used to inoculate Falcon tubes with 30 mL of LB and were incubated (*E. coli*: 37 °C; *P. syringae*: 28 °C) with shaking (120 rpm) in an orbital rotating shaker until they reached $OD_{600nm} = 0.2$. Two-fold serial dilutions of extracts (50 µL; 50–0.003%) were added into 96-well polystyrene flat-bottomed plates, and then bacterial suspensions (50 µL) were also added. For the positive control (bacteria growth control), sterile deionized water was used. Samples were then incubated for 24 h at temperatures appropriate for the tested bacteria. Optical density values were measured using an Infinite 200 PRO NanoQuant microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland). The experiment was conducted in triplicate.

2.4. Phage-Extract Coincubation Assay

In order to test direct phage–extract interactions, namely the influence of extracts on bacteriophage plaque-forming ability and titre, a coincubation assay was carried out [10]. Briefly, 1 mL of phage lysates (phi6 and T4: 10^8 PFU/mL; MS2: 10^9 PFU/mL) were added into wells of 12-well flat-bottomed polystyrene plates. Then, extracts were added (1 mL) to reach the final concentrations of 50–0.049% (two-fold serial dilutions). Phage lysate and extract-free deionized water was used as a positive control. Samples were incubated at room temperature (20 °C) for 24 h, without light access. Then, samples were collected and titrated in the TM buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgSO₄ at pH 7.5) by spotting 3 µL of each dilution (10-fold) onto an LB plate that was already coated with a top agar layer (0.7%), mixed with overnight bacterial culture (double-layer agar technique). The experiment was conducted in triplicate.

2.5. Phage-Extract Synographies

Phage–extract interaction stoichiometries were performed as described elsewhere [20], with minor modifications. To prepare the testing cultures, 5 mL of the overnight culture was diluted in LB, in order to achieve $OD_{600nm} = 1$ (approx. 1×10^9 CFU/mL). Then, 100 µL

of the bacterial suspension was inoculated into each well of the 96-well flat-bottomed plates that were previously coated with varying concentrations of phages (50 μL , final 10^2 – 10^8 PFU/mL) and extracts (50 μL , final 25–0.049%), the checkerboard of phage and extract (Figure 1). Plates were incubated for 18 h (*E. coli*: 37 °C; *P. syringae*: 28 °C) and the OD_{600nm} values were measured using an Infinite 200 PRO NanoQuant microplate reader. Afterwards, in order to test the bacterial metabolic activity, a resazurin assay was carried out, by adding the dye to the samples in the wells (final 1 mg/mL). Plates were then further incubated (*E. coli* for 3 h, *P. syringae* for 4.5 h) without light access, and then fluorescence measurements were performed using a fluorescent plate reader (Synergy HTX, BioTek, Winooski, VT, USA) at 540 nm excitation and 590 nm emission. The experiment was conducted in triplicate.

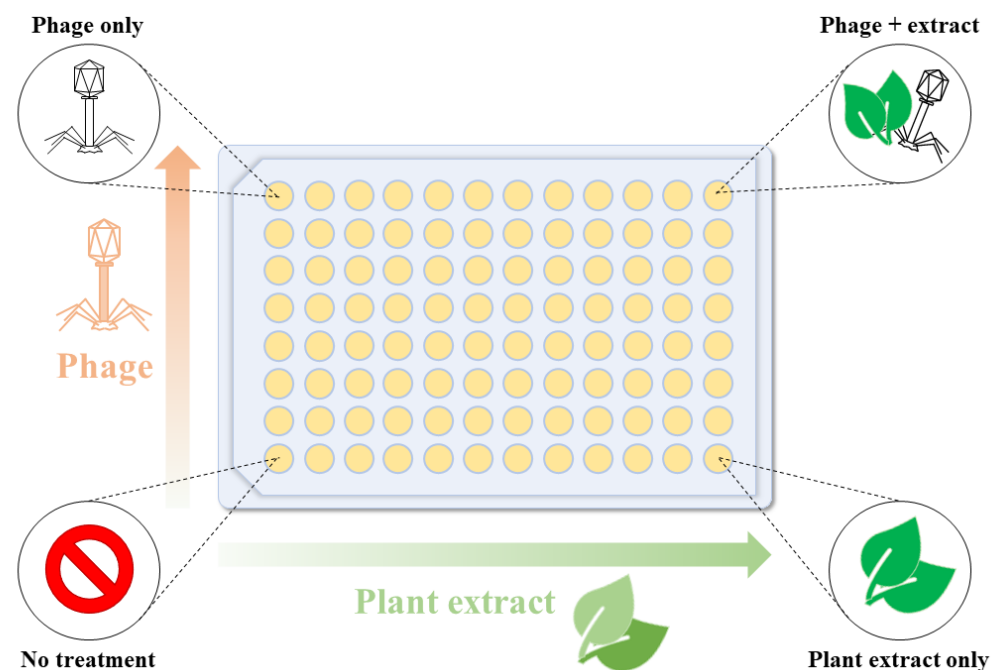


Figure 1. Synogram showing the distribution of phage–extract combinations against the bacterial inoculum.

2.6. Phage Infection and Lysis Profile Experiments

Based on results from the static (no mixing) synogram experiment, we chose combinations in which interesting phenomena were present (increased bacterial activity in resazurin assay with simultaneous OD measures showing a reduction in bacterial biomass), in order to analyse the influence of combined treatment of phage–extracts on bacterial host growth rate in real time, in a dynamic environment (mixing). Proper controls for result comparison (phage + extract maximal dose, extract maximal dose, bacterial growth control) were also applied (Table 2).

To keep the experimental assumptions of the synogram test, overnight bacterial host cultures were diluted in LB, in order to achieve OD_{600nm} = 1. Then, 5 mL of the bacterial suspensions were transferred into Falcon tubes. Afterwards, 2.5 mL of phage lysates were added (final titre 10^8 PFU/mL), along with 2.5 mL of particular plant extract concentrations, in order to obtain the chosen final concentrations (e.g., 100% extract was added to obtain a final concentration of 25%). For extract-alone treatments, instead of phage, 2.5 mL of sterile deionized water was added. For the host bacterial growth control, 5 mL of sterile deionized water was added to 5 mL of bacterial suspension. Samples were then incubated (*E. coli* at 37 °C, *P. syringae* at 28 °C) for 16 h, 150 rpm and real-time OD_{850nm} values were measured using BioSan bioreactors (BS-010160-A04, BioSan, Riga, Latvia).

Table 2. Chosen treatment combinations for real-time assessment of bacterial growth. EP: *Echinacea purpurea* extract; RG: *Ruta graveolens* extract.

Bacterial Host	Phage	Phage Titre	Extract	Extract (%)	Treatment Type
<i>P. syringae</i> DSM 21482	Phi6	10 ⁸	EP	25	Phage + extract
<i>P. syringae</i> DSM 21482	-	-	EP	25	Extract
<i>P. syringae</i> DSM 21482	Phi6	10 ⁸	EP	6.25	P+E+B combination *
<i>P. syringae</i> DSM 21482	Phi6	10 ⁸	EP	0.049	P+E+B combination *
<i>P. syringae</i> DSM 21482	-	-	-	-	Growth control
<i>E. coli</i> DSM 5695	MS2	10 ⁸	EP	25	Phage + extract
<i>E. coli</i> DSM 5695	-	-	EP	25	Extract
<i>E. coli</i> DSM 5695	MS2	10 ⁸	EP	6.25	P+E+B combination *
<i>E. coli</i> DSM 5695	MS2	10 ⁸	EP	0.049	P+E+B combination *
<i>E. coli</i> DSM 5695	-	-	-	-	Growth control
<i>E. coli</i> DSM 613	T4	10 ⁸	EP	25	Phage + extract
<i>E. coli</i> DSM 613	-	-	EP	25	Extract
<i>E. coli</i> DSM 613	T4	10 ⁸	EP	6.25	P+E+B combination *
<i>E. coli</i> DSM 613	T4	10 ⁸	EP	0.049	P+E+B combination *
<i>E. coli</i> DSM 613	-	-	-	-	Growth control
<i>P. syringae</i> DSM 21482	Phi6	10 ⁸	RG	25	Phage + extract
<i>P. syringae</i> DSM 21482	-	-	RG	25	Extract
<i>P. syringae</i> DSM 21482	Phi6	10 ⁸	RG	0.78	P+E+B combination *
<i>P. syringae</i> DSM 21482	-	-	-	-	Growth control
<i>E. coli</i> DSM 5695	MS2	10 ⁸	RG	25	Phage + extract
<i>E. coli</i> DSM 5695	-	-	RG	25	Extract
<i>E. coli</i> DSM 5695	MS2	10 ⁸	RG	3.125	P+E+B combination *
<i>E. coli</i> DSM 5695	-	-	-	-	Growth control
<i>E. coli</i> DSM 613	T4	10 ⁸	RG	25	Phage + extract
<i>E. coli</i> DSM 613	-	-	RG	25	Extract
<i>E. coli</i> DSM 613	T4	10 ⁸	RG	0.78	P+E+B combination *
<i>E. coli</i> DSM 613	-	-	-	-	Growth control

* P+E+B combination: phage, extract and bacterial combination in which interesting phenomena were detected.

2.7. Scanning Electron Microscope (SEM) Visualization

SEM micrographs were performed as an additional test in order to visualize bacterial counts and fitness during lysis profile experiments. *P. syringae* and phage phi6, along with the lowest concentration of the EP extract (0.049%), have been selected for this assay to confirm that the presence of the extract does not affect the phage lysis process. Phage phi6 with *P. syringae* was used as a lysis control. Briefly, lysis profile experiments were repeated on a smaller scale in Eppendorf tubes, in a final volume of 1 mL. After 16 h of incubation at 28 °C, the samples were moved to room temperature (21 °C). Carbon-coated copper grids (400 mesh) were then immersed in the liquid samples and the cells were allowed to adhere for 30 min. Then, grids were taken out and the excess liquid was removed with a paper sheet. After the grids had dried, the samples were fixed for 18 h at 4 °C (2% glutaraldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate (NaCac), pH 7.4). Next, samples were washed with 0.1 M sodium cacodylate and subsequently dehydrated in serial concentrations of ice-cold (−20 °C) methanol (10%, 20%, 40%, 60%, 80% and 100%) at 1 h intervals. The samples were then placed on a Petri dish and coated with a thin layer of gold in a sputter coater at room temperature (Quorum Technologies Q150R S, Laughton, East Sussex, UK). Then, the samples were viewed under scanning electron microscope (SEM). The microscopic analysis was carried out using a Vega 3 LMU microscope (Tescan, Brno-Kohoutovice, Czech Republic) and the test was performed at 25 °C, with a tungsten filament and an accelerating voltage of 10 kV.

2.8. Statistical Analysis

A one-way (plant extract antimicrobiological studies) and a two-way (phage–extract coincubation assay) ANOVA were used to statistically analyse the results, along with the

Dunnett's multiple comparisons test. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$. All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 8.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). All data are presented as the mean with standard deviation (SD).

3. Results

3.1. Antibacterial Activity of Plant Extracts

The tested aqueous plant extracts were characterized by a dry mass of 14.9476% (149,476 g/L) for EP and 22.9407% (229,407 g/L) for RG. In order to test the effects of the extracts on bacterial cells, a microdilution assay was performed.

The addition of plant extracts to the bacterial cultures cultivated in a static environment resulted in mixed effects (Figure 2). In general, the EP extract resulted in an increased bacterial biomass of *E. coli* DSM 613, whereas for *E. coli* DSM 5695, the stimulating effect was present up to a concentration of 1.56%. Lower concentrations did not influence the bacterial growth or, in minor cases, inhibited it (0.097% and 0.003%). The highest concentrations of the EP extract (50% and 25%) did not alter the growth of *P. syringae* DSM 21482, while lower concentrations generally showed inhibitory potential (Figure 2A). RG extract also showed a stimulating effect on *E. coli* DSM 613 cells in the majority of the tested concentrations, except for the highest concentration (50%), which showed an inhibitory effect, and the concentrations of 12.5%, 6.25% and 3.125%, which did not influence bacterial growth. Similar effects were observed for the RG extract and *E. coli* DSM 5695, where the majority of the tested concentrations increased the bacterial biomass, except for two highest concentrations (50% and 25%) and the lowest concentration (0.003%), that did not alter bacteria multiplication compared to the control. The addition of the RG extract to *P. syringae* DSM 21482 cells led to the most varied results: concentrations of 50%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, 0.19% and 0.003% were characterized by an inhibitory potential, while the concentrations of 25%, 1.56%, 0.78%, 0.097%, 0.049%, 0.024% and 0.012% did not affect *P. syringae* cells. However, a stimulating effect was also present and observed for two of the tested concentrations of the RG extract (0.39% and 0.006%) (Figure 2B).

3.2. Coincubation Assay

Coincubation of the tested plant extracts and bacteriophages in a static environment showed varied results (Figure 3). The addition of EP extract did not significantly influence MS2 phage counts, with the exception of two concentrations (12.5% and 1.56%) which resulted in a phage-stimulating effect. Phi6 phage in combination with the highest concentrations of the EP extract (50%, 25% and 12.5%) caused a phagocidal effect, where no phage plaques were present. Lower EP concentrations did not affect the phage counts. The combination of the EP extract with T4 phages also did not significantly alter phage plaquing fitness (Figure 3A). Similarly to the EP extract, the RG extract did not significantly influence MS2 phage counts, with the exception of two concentrations (0.19% and 0.097%) which stimulated the number of phage plaques, and one concentration (3.125%) that negatively affected phage counts. The addition of the RG extract to the phi6 phage lysate caused a significant phagocidal effect for most of the tested concentrations, with the exception of the two lowest concentrations (0.097% and 0.049%). When the RG extract was incubated with T4 phage, a significant drop in phage count was observed for three of the tested concentrations (6.25%, 1.56% and 0.097%), whereas other concentrations had no effect on the T4 phage (Figure 3B).

3.3. Phage–Extract Interaction Stoichiometries

For most of the tested samples, a darkening of the sample was present due to the dark colour of the concentrated extract. This was taken into account when analysing the results: the extract optical density background was removed from the data for a clear interpretation of the results.

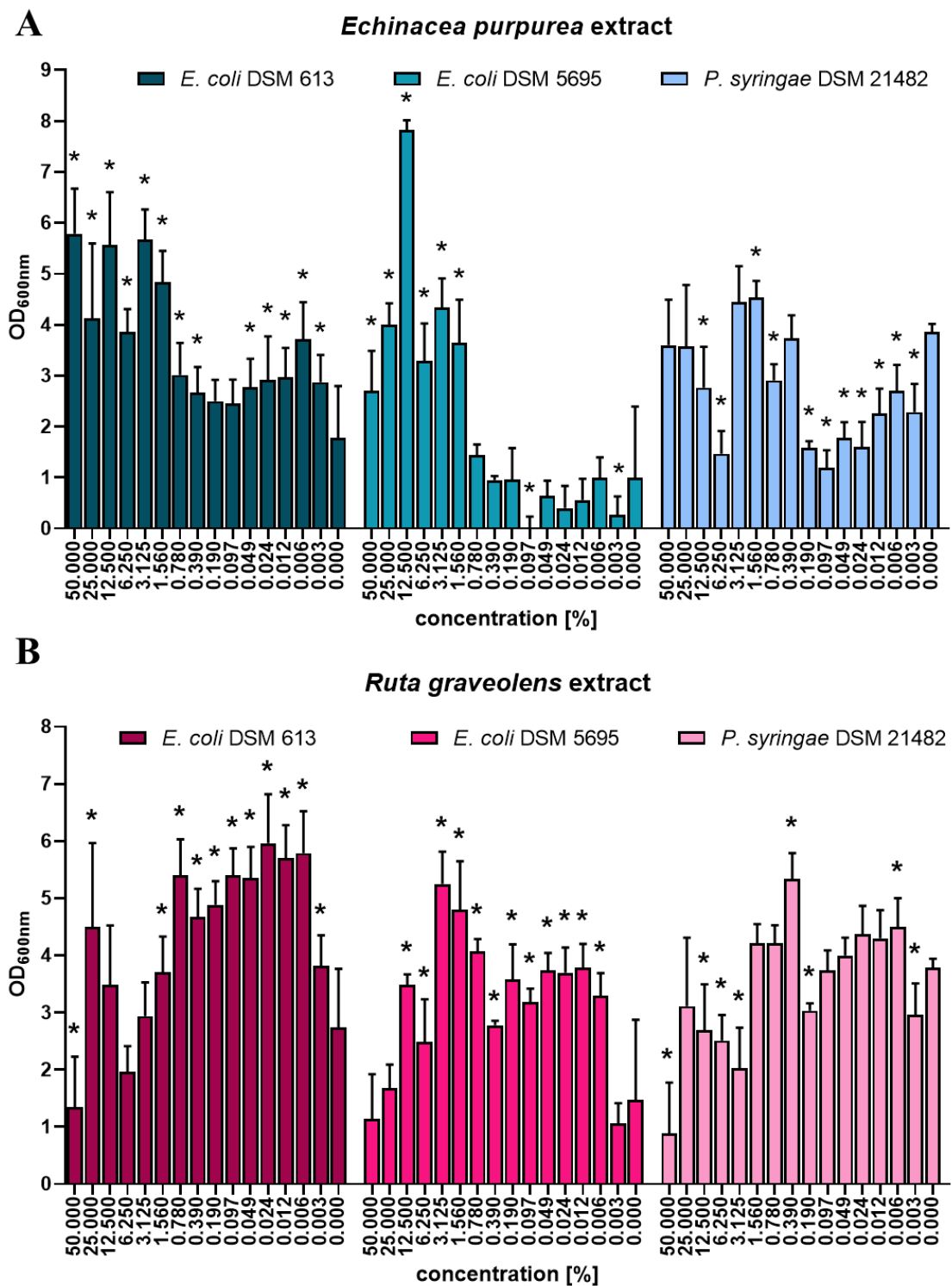


Figure 2. Bacterial biomass-altering activity of the tested plant extracts, measured after 24 h of incubation. *Echinacea purpurea* extract activity assessed by the microdilution method, (A) and *Ruta graveolens* extract activity assessed by the microdilution method (B). Error bars represent standard deviation (SD) between the samples. The means sharing the star asterisk are significantly different from the control (extract concentration 0%) at $p \leq 0.05$.

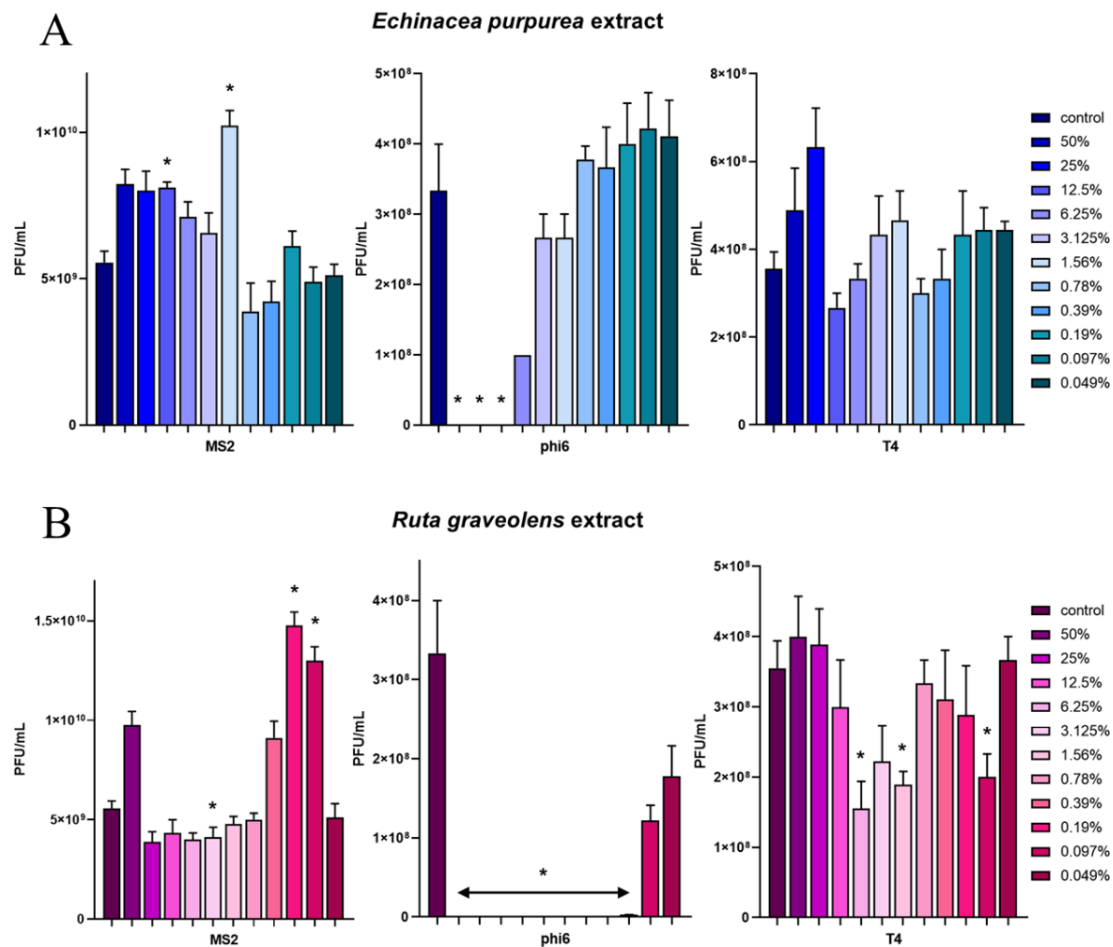


Figure 3. Phage titres (MS2, phi6 and T4) after 24 h exposure to different concentrations of plant extracts: results after coincubation of phages with *Echinacea purpurea* extract, (A) and after coincubation of phages with *Ruta graveolens* extract (B). Error bars represent standard deviation between the samples. The means sharing the star asterisk are significantly different from the control at $p \leq 0.05$.

The synogram experiment revealed complex relationship interactions between the tested extracts and bacteriophages within their bacterial hosts (Figure 4). Interestingly, in most of the cases, the highest extract concentration (25%) clearly caused an increased growth of the bacterial biomass; however, the cells were no longer active after 24 h of incubation in the stationary environment (Figure 4A',A'',B–B"). This may indicate increased cell proliferation in the initial growth stage and earlier achievement of the stationary phase due to the presence of the extracts, regardless of the added amount of phage. Specific interactions between the tested elements were also observed. Two concentrations of the EP extract (3.125% and 1.56%) caused an increased growth of *P. syringae* cells when phi6 phage was not added. However, in most combinations, the addition of phage decreased cell activity at varying degrees: the concentrations of 6.25% and 0.049% in combination with a high dose of phage (10^8 PFU/mL) caused the cells to decrease their activity by half (48.9% of the control) or remained at a level similar to the control (89.9% of the control), respectively (Figure 4A). The EP extract influenced *E. coli* DSM 5695 by increasing bacterial activity in majority of the combinations, regardless of the concentration and amount of the phage added (measured at 21 h of incubation), even when the OD measures showed almost complete reduction of the bacterial biomass (measured at 18 h of incubation) (e.g., EP in concentrations of 6.25% and 0.049%: highest and lowest concentration where the phenomenon was observed, respectively) (Figure 4A'). The EP extract showed a similar influence on *E. coli* DSM 613 cells as on *P. syringae*, however, the cell activity was more phage and extract dose-dependent. Here, the phenomenon of the OD bacterial biomass reduction

in combination with varying bacterial activity was also observed (EP 6.25% = 39.1% activity compared to the control; EP 0.049% = 112.2% activity compared to the control), while high doses of the phage were applied (10^8 PFU/mL) (Figure 4A''). The addition of the RG extract to *P. syringae* cells resulted in a general reduction of the biomass at concentrations below 0.78%, along with a loss of cell activity. Interestingly, the concentration of 0.78% without the addition of phage caused a visible rise in the bacterial activity, while with the addition of phi6 (10^8 PFU/mL), the activity of the *P. syringae* cells dropped almost by half (55.6% compared to the control) (Figure 4B). When the RG extract was combined with *E. coli* DSM 5695, an overall increase in biomass was observed, while the cell activity levels dropped compared to the control. The exception was the concentration of 3.125% in combination with the phage (10^8 PFU/mL of MS2), where the OD values decreased to 59.9% of the control, with the cell activity being 37.8% compared to the control (Figure 4B'). When *E. coli* DSM 613 was tested, a similar outcome was observed, but the amount of bacterial biomass decreased at the concentrations of RG below 0.78%, with a simultaneous decrease in the activity of bacterial cells. The biggest decrease in the OD values was detected at the concentration of 0.78% (with the T4 phage addition of 10^8 PFU/mL), while *E. coli* DSM 613 activity was 23.1% compared to the control (Figure 4B'').

3.4. Bacteriophage Lytic Performance

For the phage lysis ability test in real time, bacteriophage performance against bacteria was tested in the presence of selected extracts at different concentrations, assessed by the changes in optical density measurements when the samples were cultivated in the bioreactors with mixing (150 rpm) (Figure 5). The extract concentrations were chosen based on the results from synogram experiment (combinations in which the above-described phenomena were present, along with maximal treatment doses as the controls). Experiment time was also shortened (16 h), as the synogram experiment (>18 h) revealed unactive cells. For most of the tested samples, the darkening of the sample was present due to the dark colour of the concentrated extract. This was taken into account when analysing the data: the extract optical density background was removed from the curves for a clear interpretation of the results.

The tested extracts influenced bacterial cells and phage activity in a varied manner; however, some dependencies were noted (Figure 5). In general, high concentrations (25%) of the tested extracts resulted in a stimulating effect on bacterial cells, often cancelling the lytic effect of the phages. The combination of *P. syringae*, phage phi6 and EP at concentrations of 25% and 6.25%, resulted in growth curves similar to the control bacterial curve: no phage lysis was observed. However, the treatment combination when the EP concentration was 0.049% led to the phi6 lysis curve to be the same as the control lysis curve (only phage and bacteria) (Figure 5A). Mixtures of the MS2 phage and 25% EP extract initially resulted in a similar, though slightly worse, lysis of *E. coli* DSM 5695 at 2 h to 4 h incubation. After this time, there was a clear rebound of the curve, suggesting increased bacterial proliferation. The reduction in the EP concentration to 6.25% also led to the bacterial lysis curve being weakened, but similar to the control lysis curve; however, the lysis started quicker (after 1 h vs. 2 h for the control), and later on, it also ended quicker (after 1.5 h vs. 3 h for the control). The EP concentration of 0.049% resulted in almost identical lysis curve as in the control lysis sample, except the low extract concentration also quickened the lysis visibly (Figure 5A'). When T4 phage was present, the high concentration of the EP extract (25%) eliminated the phage lytic effect after the first 2 h of incubation, simultaneously increasing the proliferation of *E. coli* DSM 613 cells. After 2 h, the sample optical density (proliferated bacterial biomass) started to drop very slowly. The EP concentration of 6.25% resulted in a very similar growth curve as the 25% concentration, until 6 h of incubation. After that time, a visible drop in the OD was observed, probably caused by the T4 phage activity. Finally, when 0.049% of the EP extract was added to the bacteria–phage sample, after the first 10 h of incubation, the curve was fairly similar to the control bacterial growth curve, meaning that the bacterial proliferation was only slightly altered. Then, after 10 h, a visible drop in

the OD was observed, as it was in the EP 6.25% sample, suggesting the occurrence of phage activity (Figure 5A’). When the RG extract was used (25%) along with the phi6 phage, a very high proliferation rate of *P. syringae* was observed after 3.5 h of incubation. After 10 h, the growth curve stabilised, suggesting that the bacterial stationary phase was reached (Figure 5B). The reduction in the RG concentration to 0.78% led to the observable lysis of the phi6 phage. However, the lysis was delayed, since it started after 5 h of incubation (control lysis started after 2 h) and also ended later in time (after 8 h, compared to the control that ended after 3.5 h), reaching the final OD values that were almost the same as that of the lysis control (Figure 5B(II)). When the RG extract (25% and 3.125%) was mixed with the MS2 phage and added to the *E. coli* DSM 5695 cells, initially no bacterial cell growth (and even a slight decrease in OD) was observed in the first 2 h of incubation. Afterwards, the *E. coli* proliferation boost was detected first, lasting until 4.5 h of incubation. After this time, bacterial cells continued multiplying at a slower rate, reaching only slightly higher OD values compared to the control bacterial growth curve (Figure 5B’). The highest tested RG concentration (25%) mixed with the T4 phage caused the *E. coli* DSM 613 growth curve to be similar to the control growth curve, stimulating cell multiplication slightly more. When RG 0.78% was used, bacterial proliferation was visibly weakened and, interestingly, a drop in OD values was noticed after 11 h of incubation (Figure 5B’).

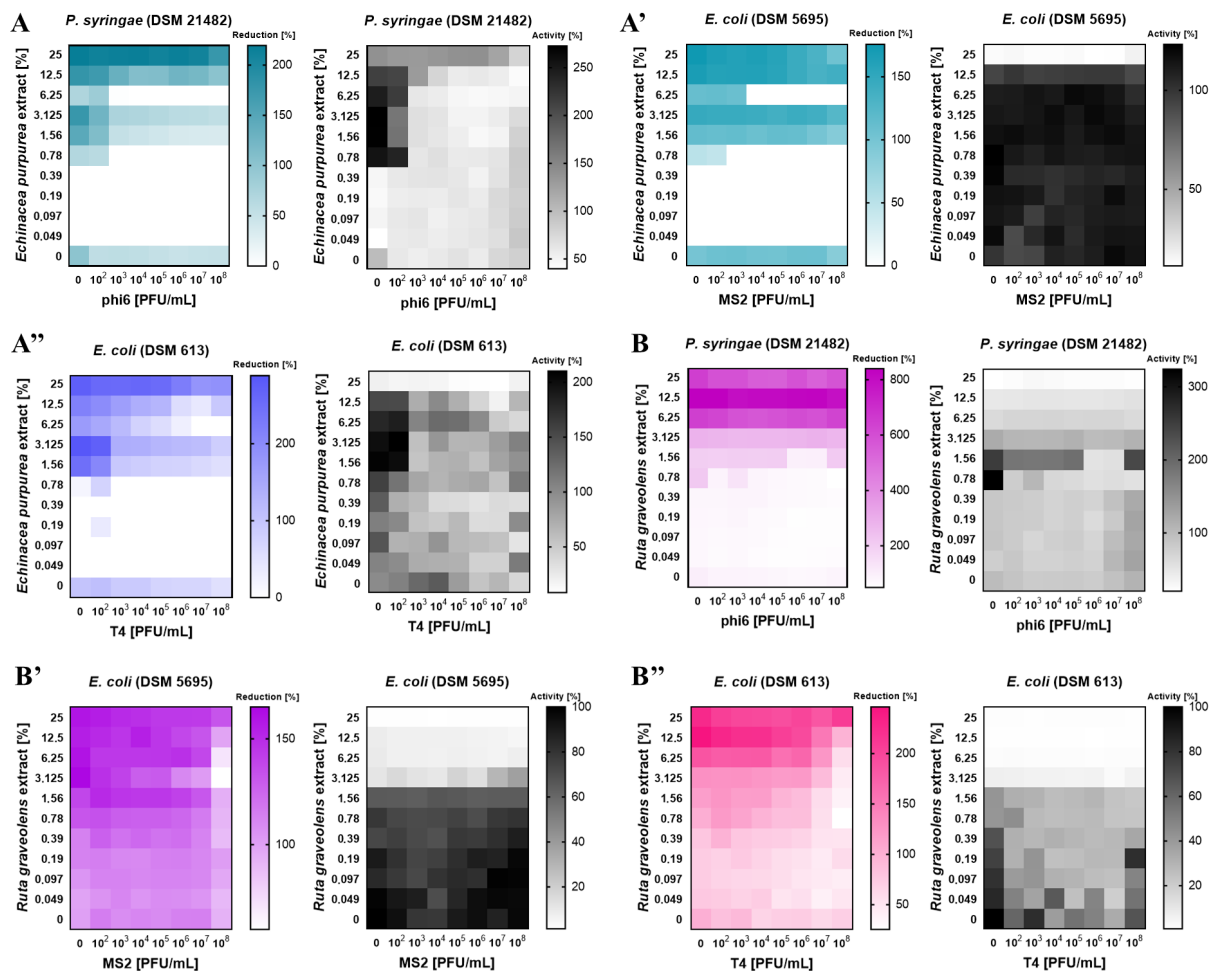


Figure 4. Effects of phage–extract combinations on host bacterial growth. Coloured heatmaps represent OD_{600nm} measurements, and black and white heatmaps represent corresponding fluorescence measurements. Combined treatment of phages with the *Echinacea purpurea* extract (A–A’), combined treatment of phages with the *Ruta graveolens* extract (B–B’). Synograms ($t = 24$ h) represent the mean reduction (% of the control) or activity (% of the control) percentage of each treatment from the three replicates.

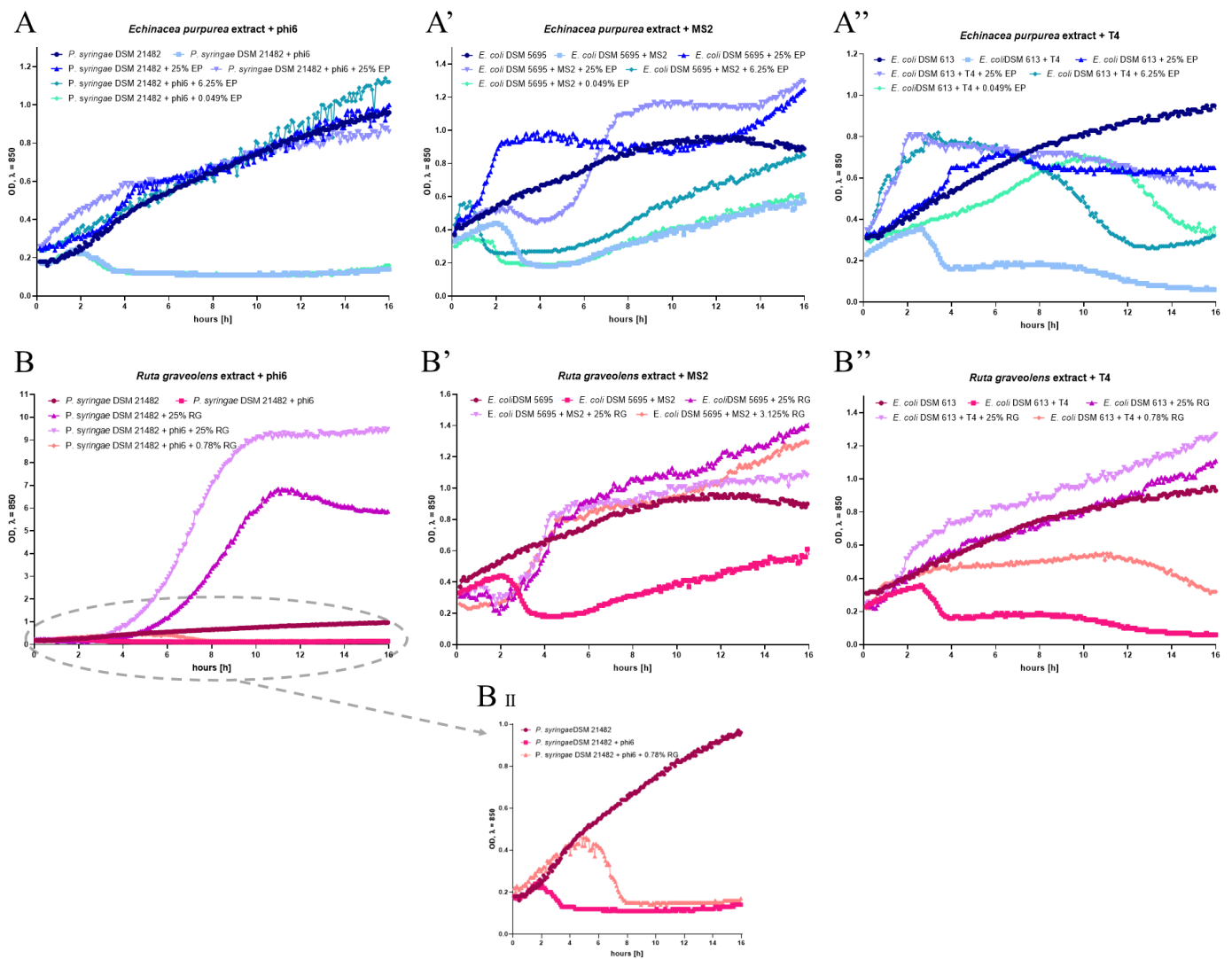


Figure 5. Bacteriophage lytic kinetics with different extract concentrations, chosen in the synogram experiment. Combined treatment of phages with the *Echinacea purpurea* extract (phi6 (A); MS2 (A'); T4 (A'')), combined treatment of phages with the *Ruta graveolens* extract (phi6 (B); MS2 (B'); T4 (B'')); phi6 exported results of the chosen curves from the B graph (B(II))).

3.5. Microscopic Imaging

After the bioreactor lysis experiment was performed, SEM micrographs were carried out as an additional test, in order to visualize bacterial counts and fitness. *P. syringae* and phage phi6, along with the lowest concentration of the EP extract (0.049%), have been selected for this assay, and it was confirmed that the presence of the extract does not affect the bacterial cells and in consequence, the phage lysis process (Figure 6A). Compared to the control, when phage phi6 with *P. syringae* was used (Figure 6B), the addition of the EP extract did not visibly influence bacterial cells: the cell count was similar along with *P. syringae* morphology, suggesting an unchanged bacterial fitness (Figure 6).

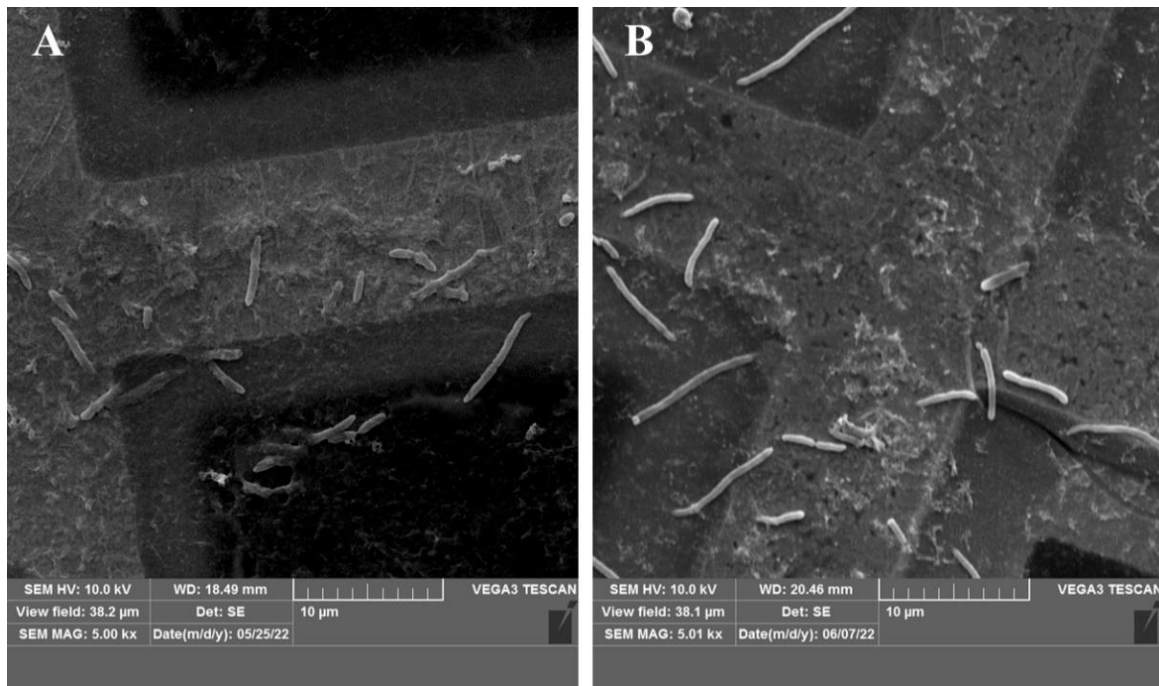


Figure 6. SEM micrographs of the mixtures of bacteria *P. syringae* and phage phi6 (A), compared to the same mixture of *P. syringae* and phi6, but with the addition of 0.049% *Echinacea purpurea* extract (B).

4. Discussion

Herbs such as *E. purpurea* and *R. graveolens* are commonly used for medical purposes, since they have many beneficial effects for humans [21–24], but also animals, for which these herbs can serve as feed additives or alternative feed source [25–27]. It has also been shown that phages can be used as feed additives to reduce bacteria in animal preslaughter, without negatively impacting microbial communities [28]. Therefore, in our work, we tested the possible interactions of *Echinacea purpurea* (L.) Moench (EP) and *Ruta graveolens* (RG) extracts and lytic phages as antibacterial agents (which can also serve as models of eukaryotic viruses) in the environment of bacteria. For this study, we have chosen well-known and studied phage models (phi6, MS2 and T4) from a certified collection, so the result interpretation will not be additionally complicated by using wild, unknown phages. Moreover, the selected phages were characterized by different sizes and specific features (Table 1) to ensure model diversity. Additionally, phage-matching bacterial hosts functioned as pathogens related to fauna and flora diseases (*P. syringae* and *E. coli*).

EP and RG methanol extracts revealed diverse and multidimensional interactions with the mixtures of phages and their bacterial hosts. In order to explain these interactions, it is necessary to draw general conclusions from the performed experiments and propose hypotheses explaining the results.

The lysis profile experiment of the EP extract, at the concentration of 25% in combination with the MS2 phage and *E. coli*, resulted in limited phage lytic activity at the beginning of the curve, then stimulating the growth of bacteria. The 6.25% concentration caused weakening of the phage lysis, and 0.049% generated similar lysis outcomes compared to the control lysis. These concentrations did not influence phage activity in the coincubation test, but stimulated the host cells during a modified MIC test (static conditions/no mixing), therefore the presented results are a consequence of the extract's concentration-dependent influence on bacteria that was more pronounced than the phage lytic activity. When the phi6 phage and *P. syringae* were tested, the EP concentrations of 25% and 6.25% resulted in the lack of phage lysis (curves comparable to the control bacterial growth), while at 0.049%, the lysis curve was the same as the lysis control. The highest tested concentration (25%) also showed phagocidal activity, therefore the curve assay effect is the result of the

extract influence on the phage. Since no phage killing effect was present in the coincubation test at the lower EP concentrations, the middle concentration (6.25%) is the result of the only extract effect on bacterial cells (or mixing could turn this concentration phagocidal), which disappeared at a low concentration of 0.049%. The lack of EP 0.049% effect was also additionally proven by the SEM micrographs. When mixtures of EP extract with the T4 phage and *E. coli* were studied, the highest EP concentration (25%) caused initial bacterial stimulation, followed by a slow decrease in the *E. coli* proliferation after 6 h of incubation. The 6.25% EP extract resulted in a similar outcome, however the drop in bacterial biomass after 6 h was more pronounced. When the concentration of 0.049% was used, the curve was initially similar to the control growth curve, and after 10 h of incubation, a gradual decrease in the cell density was observed. The tested concentrations did not have any influence on the phage T4 in the coincubation assay, and it stimulated bacterial growth in the modified MIC assay; therefore, these results are again explained through the extract concentration-dependent stimulating influence on bacteria, that is stronger than the phage lytic activity. Moreover, the effect is also time-dependent, as it fades away with time, allowing for phage lysis afterwards.

Our hypotheses of EP extract bacterial stimulating effects are in line with the results of other authors, where the activity of *E. purpurea* against bacterial cells varied. The general antibacterial properties of *E. purpurea* are detected mainly for their ethanol extracts [29]. Nevertheless, in the work, six different echinacea commercial ethanol extracts were analysed, including extracts from *E. purpurea* roots and *E. purpurea* aerial parts, and *E. coli* was a species relatively insensitive to those extracts: no bacterial reducing effect was detected [6]. When the plant activity against Gram-negative bacteria was observed, hydroethanol extracts of the aerial parts of *E. purpurea* were used, significantly inhibiting *E. coli* growth [30]. At the same time, the work of other authors highlights that even in commercial hydroalcoholic echinacea extracts (roots of *Echinacea purpurea* L. Moench; roots, leaves, flowers and seeds of *E. purpurea*; aerial parts and roots of *E. purpurea*; and roots of *E. angustifolia*), obtained from certified trading houses, there is a difference in the extracts' properties [31]. That points out the differences of the plant activity against bacteria, that seems to be associated with the type of extraction and parts of the plant used in the experiments. As performed in our work, when the methanolic extract of *E. purpurea* aerial parts was tested, there was no evidence of microbicide activity against *E. coli*, even at the highest tested concentration of 20 mg/mL [2] (highest tested concentration in our work: 25%, 37.4 g/L). Similar to our studies, in which the stimulating effect of EP was detected, it has been shown that echinacea supplementation (dietary supplement; aerial and root parts of the plant; patented extraction method) can stimulate bacteria, namely the selected groups of human gastrointestinal tract microbiota [5]. Moreover, studies have shown that *E. purpurea* also possesses antiviral activity [21,32–34] that could support our findings on the EP extract antiphage activity.

The lysis profile experiments of the RG extract at the concentrations of 25% and 3.125% with the MS2 phage and *E. coli* generally resulted in slightly increased biomass production compared to the control bacterial growth. At the coincubation test, RG 25% did not influence phage viability, whereas RG 3.125% caused a drop in MS2 counts. A modified microdilution assay in static conditions showed that RG 25% did not alter bacterial growth, whereas RG 3.125% stimulated *E. coli*. Therefore, the presented results concerning the higher extract concentration are a consequence of introducing mixing to the experimental environment, indicating that RG 25% could have become bacteria-stimulating and/or phage-inhibitory (as it was detected for RG 3.125%). That statement is additionally confirmed by the control curve of *E. coli* + RG 25%, which is also characterized by a higher biomass production compared to the control *E. coli* growth. The stimulating effect of the RG extract was also observed in the combination of *P. syringae* and phage phi6, where RG 25% caused greatly enhanced bacterial proliferation. When RG 0.78% was used, phage lysis was present, but delayed by approximately 3 h. Coincubation assay revealed that both RG concentrations showed phagocidal activity, whereas a modified MIC test demonstrated a lack of their

influence on bacteria. These interactions concerning RG 25% are again explained by both the phage-inhibitory and bacteria-stimulating (gained in the mixing environment) RG activity, since bacteria + extract control (*P. syringae* + RG 25%) also showed pronounced bacteria-stimulating effect. The results observed for RG 0.78% are therefore the effect of reducing the stimulating influence of the extract by lowering its concentration and simultaneously abolishing the phagocidal activity of the extract in a dynamic environment. When mixtures of RG with T4 phage and *E. coli* were studied, the RG concentration of 25% resulted in slight bacterial stimulation, whereas RG 0.78% caused weakened lysis, that was also extended in time. These concentrations did not influence phage viability in the previous experiment, while they positively altered bacterial growth in the modified MIC test. Here, the results for RG 25% can be explained by the bacteria-stimulating effect of the extract and probable gain of phage-inhibitory activity in the mixing environment. Therefore, when the RG concentration was lower (0.78%), the extract phage-inhibitory influence was weaker, allowing for limited lysis, so the effect was also concentration-dependent.

Unfortunately, there is limited knowledge on *Ruta graveolens* activity on Gram-negative bacterial cells performed with modern experimental methods. Moreover, the tendency of differentiated plant activity on bacteria associated with the type of extraction and used plant parts is also observed. The study in which antibacterial activity of ethanol, methanol, chloroform and distilled water extracts of *R. graveolens* leaves was tested by the disk diffusion methods, the methanol and chloroform extracts recorded better antibacterial activity than the ethanol extract, and the water extract did not exert any activity. Moreover, the authors also point out that the phytochemical analysis of different solvent extracts show considerable change in the nature of the chemicals [35]. Other authors demonstrate that aquatic, ethanolic and methanolic extracts likely of the whole *R. graveolens* plant (not specified in the paper) have been almost equally effective against *E. coli* (25 g/L MIC aquatic extract; 12.5 g/L MIC ethanolic extract; 25 g/L MIC methanolic extract) and *P. aeruginosa* (25 g/L MIC aquatic extract; 25 g/L MIC ethanolic extract; 25 g/L MIC methanolic extract). The experiments were performed using disk diffusion and well diffusion methods [36]. Another study designed to screen various solvent extracts of *Ruta graveolens* used leaves, stems and seeds of the plant, extracted by four different solvents, receiving ethanolic, methanolic, chloroform and aqueous extracts. In this work, the disk diffusion method showed that *B. subtilis* demonstrated a high zone of inhibition (20 mm) at 200 mg/mL of methanolic extract, but *E. coli* and *C. tropicalis* did not show any zone of inhibition against any extract [37]. The lack of *R. graveolens* plant extract activity against *E. coli* was also found in the work of other authors, where methanol, petroleum ether, ethyl acetate and water–methanol extracts of the plant aerial parts were tested, also using the disk diffusion method [38]. This phenomenon was also proven in the works of other authors, in which hydro and hydroalcoholic extracts of *Ruta graveolens* (tested by the disk diffusion method and serial microdilution method) did not show an inhibitory effect on the growth of studied bacteria (i.a. *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. Typhi*) up to a concentration of 5 mg/mL [39]. Bearing in mind the reports showing the lack of antibacterial effect of the *R. graveolens* extract concluded from outdated research methods, the stimulating effect of RG presented in our work is possible. Moreover, it has been reported that *R. graveolens* compounds show stimulating activity on the growth of fungi in a concentration-dependent manner, when tested using a 96-well microtiter assay [40]. Even if there are no papers describing the influence of *R. graveolens* on bacteriophages, the antiviral activity of the plant was confirmed on acyclovir-resistant HSV-1 [41], which can support our findings regarding the RG antiphage activity.

Currently, the literature describes the simultaneous application of phages and plant extracts or the effects of extracts on phages at a limited degree, and even fewer works describe their interactions in the environment of bacterial hosts. Previous works have mainly focused on the plaque-forming ability of the phages after their contact with plant extracts [11,42–44]. However, there are some findings describing more complex interactions. One shows the influence of a crude acetone extract of the pit of date palm (*Phoenix dactylifera*

L.) on the lytic *Pseudomonas* phage ATCC 14209-B1 by changes in the absorbance. It was found that the extract showed the ability to inhibit the infectivity of the phage and completely prevent bacterial lysis. Similarly to our work, authors observed that the higher the concentration, the bigger the phage inhibition [45]. However, a limited number of extract concentrations were used, and no information of the extract influence on bacteria alone was present. In another work, aqueous extract of *E. amoenum* dried flower was used, and the antiviral activity against *S. aureus* bacteriophage 3C was determined by the agar overlay method and one-step growth experiment. Antibacterial activity was determined by the agar well diffusion and minimum inhibitory concentration methods. The extract also showed concentration-dependent antiviral activity and reduced the yield of phage [46]. However, since a subinhibitory concentration of the extract was used in the extract–bacteria–phage tests, the observed effects could also be due to the influence of the extract on bacterial cells to some extent. The importance of performing multiple tests in order to understand such complex interactions (that can change in different environments) was noticed in the study of other authors. The influence of phenolic compounds from pomegranate peels (Ps), grape seeds (GSs) and black cumin (NS) on *S. aureus* phages was investigated by examining the effect of phenolic extracts on phage plaque sizes, and later calculating phage titers and bacterial counts from the mixed culture (phages–compounds–bacteria) experiment. It was found that only the NS extract had a positive effect on phage activity by increasing the phage plaque size; however, the same effect was not reflected in phage titers in a liquid medium. Overall, no synergistic effect was observed in liquid media experiments. Moreover, it was found that P and GS extracts inhibited phage activity, and the observed interactions were generally found to be more closely related to antagonism, similarly to what we found in our work [47]. Finally, comparably to some findings in our study, it was observed that plant extracts in combination with virulent phages can significantly reduce the bacterial concentration compared to untreated and extract-treated controls up to 6 h, but this reduction did not extend further (decreased over time). Moreover, in most cases, the phage and extract combinations did not significantly reduce the bacterial content compared to phages alone [7].

In our work, we also hypothesise that mixing itself can be responsible for some of the observed effects of the EP and RG plant extracts (by changing the environment conditions). It is worth noting that in our previous research, we also observed the stimulation of bacteria by plant extracts after introducing the mixtures into the dynamic (mixing) environment of a bioreactor [18]. This phenomenon can simply be explained by the enhanced physical contact of the extract molecules, bacterial cells and phages caused by mixing, which consequently enhances the interactions in the mixture that could not be observed in static conditions. However, a thorough understanding of this phenomenon may require further research.

5. Conclusions

This is a first study describing interactions between the echinacea and rue plant extracts in combination with phages, in a bacterial host milieu. The effects of low concentrations of *E. purpurea* and *R. graveolens* methanol extracts, in a dynamic environment (mixing bioreactor) on the course of phage lysis (phage activity), depends on the species of the phage and bacterial host. High concentrations of the extracts can eliminate the phage lytic activity to a large extent by exerting a stronger stimulating effect on bacterial cells, however, gaining antiphage activity of those concentrations in a dynamic environment is also possible. Moreover, in some cases, extracts can affect the phage activity itself, regardless of the phage and host species. The interactions of phage–extract factors against bacteria in a static environment are often different than in a dynamic environment; therefore, many varied experiments should be performed, especially when examining multifactorial mixtures. Further studies are needed to understand the basics of the interactions between phages and plant extracts for the possible future use of the phage–extract combinations for biocontrol purposes.

Author Contributions: Conceptualization, X.S. and P.N.; methodology, X.S., M.M. and P.N.; validation, X.S. and P.N.; formal analysis, X.S.; investigation, X.S., M.M. and M.O.; resources, X.S., M.M. and P.N.; data curation, X.S. and M.O.; writing—original draft preparation, X.S. and P.N.; writing—review and editing, X.S., M.M., M.O. and P.N.; visualization, X.S.; supervision, M.M. and P.N.; project administration, X.S., M.M. and P.N.; funding acquisition, M.M. and P.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ghramh, H.A.; Ibrahim, E.H.; Kilnay, M.; Ahmad, Z.; Alhag, S.K.; Khan, K.A.; Taha, R.; Asiri, F.M. Silver nanoparticle production by *Ruta graveolens* and testing its safety, bioactivity, immune modulation, anticancer, and insecticidal potentials. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2020**, *24*, 5626382. [[CrossRef](#)]
2. Coelho, J.; Barros, L.; Dias, M.I.; Finimundy, T.C.; Amaral, J.S.; Alves, M.J.; Calhella, R.C.; Santos, P.F.; Ferreira, I.C.F.R. *Echinacea purpurea* (L.) Moench: Chemical characterization and bioactivity of its extracts and fractions. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 125. [[CrossRef](#)]
3. Reddy, D.N.; Al-Rajab, A.J. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of *Ruta graveolens* L. volatile oils. *Cogent Chem.* **2016**, *2*, 1220055. [[CrossRef](#)]
4. Bañuelos-Valenzuela, R.; Delgadillo-Ruiz, L.; Echavarría-Cháirez, F.; Delgadillo-Ruiz, O.; Meza-López, C. Chemical composition and FTIR of ethane extracts of *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* and *Ruta graveolens*. *Agrociencia* **2018**, *52*, 309–321.
5. Hill, L.L.; Foote, J.C.; Erickson, B.D.; Cerniglia, C.E.; Denny, G.S. *Echinacea purpurea* supplementation stimulates select groups of human gastrointestinal tract microbiota. *J. Clin. Pharm. Ther.* **2006**, *31*, 599–604. [[CrossRef](#)]
6. Sharma, M.; Vohra, S.; Arnason, J.T.; Hudson, J.B. *Echinacea* extracts contain significant and selective activities against human pathogenic bacteria. *Pharm. Biol.* **2008**, *46*, 111–116. [[CrossRef](#)]
7. Pimchan, T.; Cooper, C.; Eumkeb, G.; Nilsson, A. In vitro activity of a combination of bacteriophages and antimicrobial plant extracts. *Lett. Appl. Microbiol.* **2018**, *66*, 182–187. [[CrossRef](#)]
8. Abedon, S.T.; García, P.; Mullany, P.; Aminov, R. Editorial: Phage therapy: Past, present and future. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 981. [[CrossRef](#)]
9. You, J.; Zhang, Y.; Hu, Z. Bacteria and bacteriophage inactivation by silver and zinc oxide nanoparticles. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2011**, *85*, 161–167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Stachurska, X.; Cendrowski, K.; Pachnowska, K.; Piegat, A.; Mijowska, E.; Nawrotek, P. Nanoparticles influence lytic phage T4-like performance in vitro. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Delitheos, A.; Tiligada, E.; Yannitsaros, A.; Bazos, I. Antiphage activity in extracts of plants growing in Greece. *Phytomedicine* **1997**, *4*, 117–124. [[CrossRef](#)]
12. Ribeiro, J.M.; Pereira, G.N.; Kobayashi, R.K.; Nakazato, G. Antiphage activity of natural and synthetic substances: A new age for antivirals? *Future Microbiol.* **2020**, *15*, 767–777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Fedorenko, A.; Grinberg, M.; Orevi, T.; Kashtan, N. Survival of the enveloped bacteriophage Phi6 (a surrogate for SARS-CoV-2) in evaporated saliva microdroplets deposited on glass surfaces. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 22419. [[CrossRef](#)]
14. Whitworth, C.; Mu, Y.; Houston, H.; Martinez-Smith, M.; Noble-Wang, J.; Coulliette-Salmond, A.; Rose, L. Persistence of bacteriophage Phi6 on porous and nonporous surfaces and the potential for its use as an Ebola virus or coronavirus surrogate. *Appl. Environ. Microbiol.* **2020**, *86*, e01482-20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Stachurska, X.; Roszak, M.; Jabłońska, J.; Mizielińska, M.; Nawrotek, P. Double-layer agar (DLA) modifications for the first step of the phage-antibiotic synergy (PAS) identification. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1306. [[CrossRef](#)]
16. Kropinski, A.M.; Mazzocco, A.; Waddell, T.E.; Lingohr, E.; Johnson, R.P. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. In *Bacteriophages. Methods in Molecular Biology*; Clokie, M.R., Kropinski, A.M., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2009; Volume 501, pp. 69–76.
17. Salachna, P.; Grzeszczuk, M.; Meller, E.; Mizielińska, M. Effects of gellan oligosaccharide and NaCl stress on growth, photosynthetic pigments, mineral composition, antioxidant capacity and antimicrobial activity in red perilla. *Molecules* **2019**, *24*, 3925. [[CrossRef](#)]
18. Ordon, M.; Nawrotek, P.; Stachurska, X.; Schmidt, A.; Mizielińska, M. Mixtures of *Scutellaria baicalensis* and *Glycyrrhiza* L. extracts as antibacterial and antiviral agents in active coatings. *Coatings* **2021**, *11*, 1438. [[CrossRef](#)]

19. Wiegand, I.; Hilpert, K.; Hancock, R.E.W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 163–175. [[CrossRef](#)]
20. Gu Liu, C.; Green, S.I.; Min, L.; Clark, J.R.; Salazar, K.C.; Terwilliger, A.L.; Kaplan, H.B.; Trautner, B.W.; Ramig, R.F.; Maresso, A.W. Phage-antibiotic synergy is driven by a unique combination of antibacterial mechanism of action and stoichiometry. *MBio* **2020**, *11*, e01462-20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Manayi, A.; Vazirian, M.; Saeidnia, S. *Echinacea purpurea*: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods. *Pharmacogn. Rev.* **2015**, *9*, 63. [[CrossRef](#)]
22. Barnes, J.; Anderson, L.A.; Gibbons, S.; Phillipson, J.D. *Echinacea* species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): A review of their chemistry, pharmacology and clinical properties. *J. Pharm. Pharmacol.* **2005**, *57*, 929–954. [[CrossRef](#)]
23. Jinous, A.; Roghaieh, K. Phytochemistry and pharmacological properties of *Ruta graveolens* L. *J. Med. Plant Res.* **2012**, *6*, 3942–3949. [[CrossRef](#)]
24. Parray, S.A.; Bhat, J.U.; Ahmad, G.; Jahan, N.; Sofi, G.; Iqbal, S.M.F. *Ruta graveolens*: From traditional system of medicine to modern pharmacology: An overview. *Am. J. Pharm. Tech. Res.* **2012**, *2*, 239–252.
25. Maass, N.; Bauer, J.; Paulicks, B.R.; Böhmer, B.M.; Roth-Maier, D.A. Efficiency of *Echinacea purpurea* on performance and immune status in pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2005**, *89*, 244–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Daryin, A.; Kershov, N.; Shishkina, T.; Guseva, T. Efficiency of using *Echinacea purpurea* in feeding laying hens of a parent flock. *Sci. Pap. Ser. D Anim. Sci.* **2020**, *63*, 112.
27. Ayala Martínez, M.; Zepeda-Bastida, A.; Soto-Simental, S. Dietary supplementation effects with *Ruta graveolens* on performance, carcass traits and meat quality on rabbits. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* **2020**, *11*, 1220–1230. [[CrossRef](#)]
28. Thanki, A.M.; Mignard, G.; Atterbury, R.J.; Barrow, P.; Millard, A.D.; Clokie, M.R. Prophylactic delivery of a bacteriophage cocktail in feed significantly reduces *Salmonella* colonization in pigs. *Microbiol. Spectr.* **2022**, *10*, e00422-22. [[CrossRef](#)]
29. Sharifi-Rad, M.; Mnayer, D.; Morais-Braga, M.F.B.; Carneiro, J.N.P.; Bezerra, C.F.; Coutinho, H.D.M.; Salehi, B.; Martorell, M.; del Mar Contreras, M.; Soltani-Nejad, A.; et al. *Echinacea* plants as antioxidant and antibacterial agents: From traditional medicine to biotechnological applications. *Phytother. Res.* **2018**, *32*, 1653–1663. [[CrossRef](#)]
30. Stanisavljević, I.; Stojičević, S.; Veličković, D.; Veljković, V.; Lazić, M. Antioxidant and antimicrobial activities of *Echinacea* (*Echinacea purpurea* L.) extracts obtained by classical and ultrasound extraction. *Chin. J. Chem. Eng.* **2009**, *17*, 478–483. [[CrossRef](#)]
31. Aarland, R.C.; Bañuelos-Hernández, A.E.; Fragoso-Serrano, M.; Sierra-Palacios, E.D.C.; Díaz de León-Sánchez, F.; Pérez-Flores, L.J.; Rivera-Cabrera, F.; Mendoza-Espinoza, J.A. Studies on phytochemical, antioxidant, anti-inflammatory, hypoglycaemic and antiproliferative activities of *Echinacea purpurea* and *Echinacea angustifolia* extracts. *Pharm. Biol.* **2017**, *55*, 649–656. [[CrossRef](#)]
32. Vimalanathan, S.; Schoop, R.; Hudson, J. High-potency anti-influenza therapy by a combination of *Echinacea purpurea* fresh herb and root tinctures. *J. App. Pharm. Sci.* **2013**, *3*, 1–5.
33. Hudson, J.B. Applications of the phytomedicine *Echinacea purpurea* (Purple Coneflower) in infectious diseases. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *2012*, 769896. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Pleschka, S.; Stein, M.; Schoop, R.; Hudson, J.B. Anti-viral properties and mode of action of standardized *Echinacea purpurea* extract against highly pathogenic avian influenza virus (H5N1, H7N7) and swine-origin H1N1 (S-OIV). *Virology* **2009**, *6*, 197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Amabye, T.G. Phytochemical screening and evaluation of antibacterial activity of *Ruta graveolens* L.-a medicinal plant grown around Mekelle, Tigray, Ethiopia. *Nat. Prod. Chem. Res.* **2015**, *3*, 1000195. [[CrossRef](#)]
36. Hashemi Karouei, S.M. Antifungal and antibacterial effects of *Ruta graveolens* extracts. *Int. J. Mol. Clin. Microbiol.* **2015**, *5*, 475–480.
37. Azalework, H.G.; Sahabjada, A.J.; Arshad, T.M. Phytochemical investigation, GC-MS profile and antimicrobial activity of a medicinal plant *Ruta graveolens* L. from Ethiopia. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2017**, *9*, 29–34. [[CrossRef](#)]
38. Ivanova, A.; Mikhova, B.; Najdenski, H.; Tsvetkova, I.; Kostova, I. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Ruta graveolens*. *Fitoterapia* **2005**, *76*, 344–347. [[CrossRef](#)]
39. Moghadam, M.A.J.; Honarmand, H.; Falah-Delavar, S.; Saeidinia, A. Study on antibacterial effect of *Ruta graveolens* extracts on pathogenic bacteria. *Ann. Biol. Res.* **2012**, *3*, 4542–4545.
40. Oliva, A.; Meepagala, K.M.; Wedge, D.E.; Harries, D.; Hale, A.L.; Aliotta, G.; Duke, S.O. Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 890–896. [[CrossRef](#)]
41. Ebrahimi, E.; Mousavi-Jazayeri, S.M.; Rezaee, M.B.; Parsania, M. Antiviral effects of *Aloe vera* (L.) Burm. f. and *Ruta graveolens* L. extract on acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1. *J. Med. Plants By-Prod.* **2021**, *10*, 103–108. [[CrossRef](#)]
42. Awasthi, L.P.; Menzel, G. Effect of root extract from *Boerhaavia diffusa* L., containing an antiviral principle upon plaque formation of RNA bacteriophages. *Zentralbl. Mikrobiol.* **1986**, *141*, 415–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Kamimoto, M.; Nakai, Y.; Tsuji, T.; Shimamoto, T.; Shimamoto, T. Antiviral effects of persimmon extract on human norovirus and its surrogate, bacteriophage MS2. *J. Food Sci.* **2014**, *79*, M941–M946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Cock, I.; Kalt, F.R. A modified MS2 bacteriophage plaque reduction assay for the rapid screening of antiviral plant extracts. *Pharmacogn. Res.* **2010**, *2*, 221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Jassim, S.A.; Naji, M.A. In vitro evaluation of the antiviral activity of an extract of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) pits on a *Pseudomonas* phage. *eCAM* **2010**, *7*, 57–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

46. Abolhassani, M. Antiviral activity of borage (*Echium amoenum*). *Arch. Med. Sci.* **2010**, *6*, 366–369. [[CrossRef](#)]
47. Tayyarcan, E.K.; Acar Soykut, E.; Menteş Yılmaz, O.; Boyacı, I.H.; Khaaladi, M.; Fattouch, S. Investigation of different interactions between *Staphylococcus aureus* phages and pomegranate peel, grape seed, and black cumin extracts. *J. Food Saf.* **2019**, *39*, e12679. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Załącznik 2

Kopie suplementów publikacji naukowych wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską

Xymena Stachurska

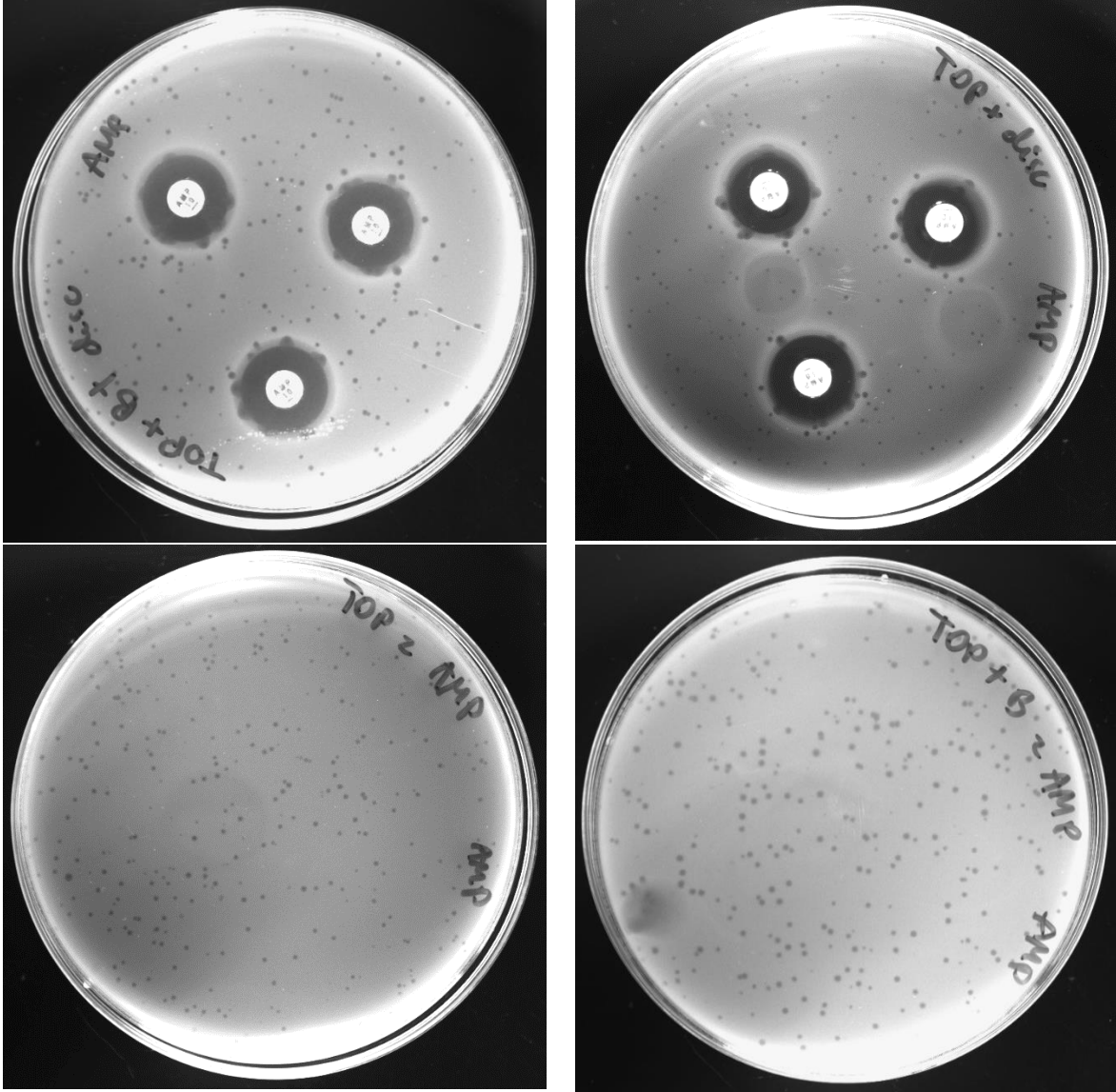
Rozprawa doktorska

**WPLYW WYBRANYCH CZYNNIKÓW PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH NA
AKTYWNOŚĆ BAKTERIOLITYCZNĄ BAKTERIOFAGÓW**

Double-Layer Agar (DLA) Modifications for the First Step of the Phage-Antibiotic Synergy (PAS) Identification

Xymena Stachurska, Marta Roszak, Joanna Jabłońska, Małgorzata Mizielińska and Paweł Nawrotek

Supplementary Material



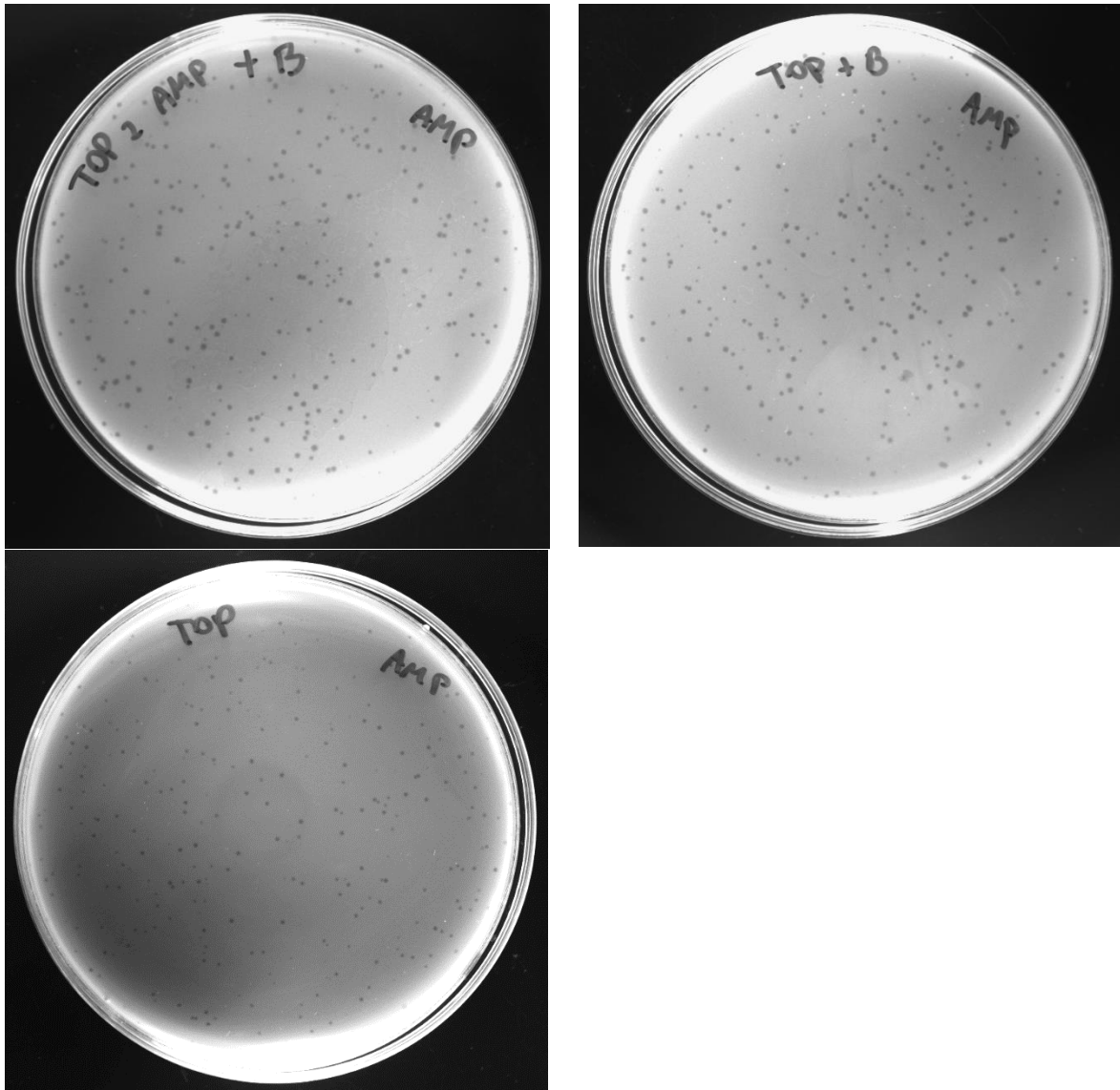
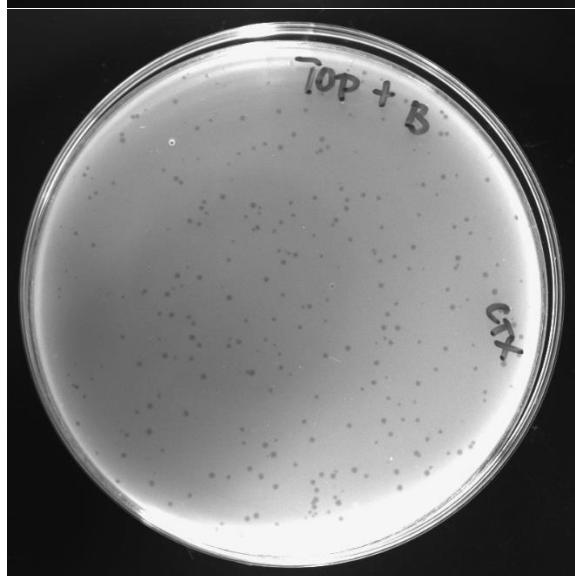
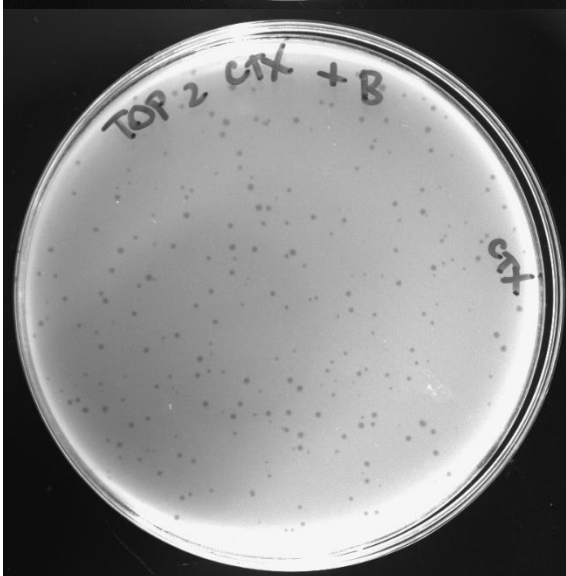
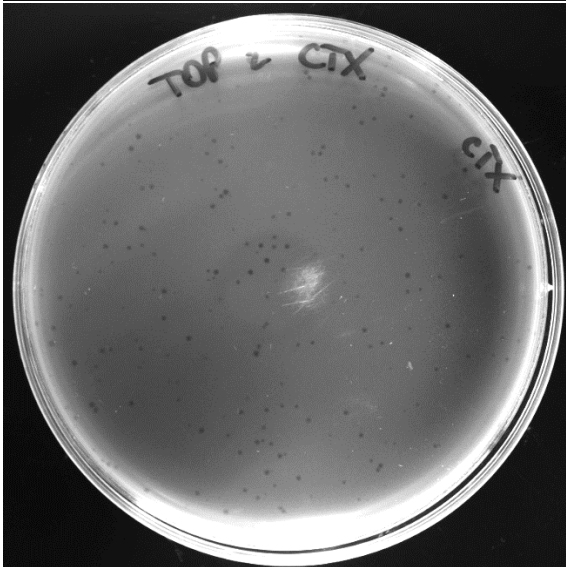
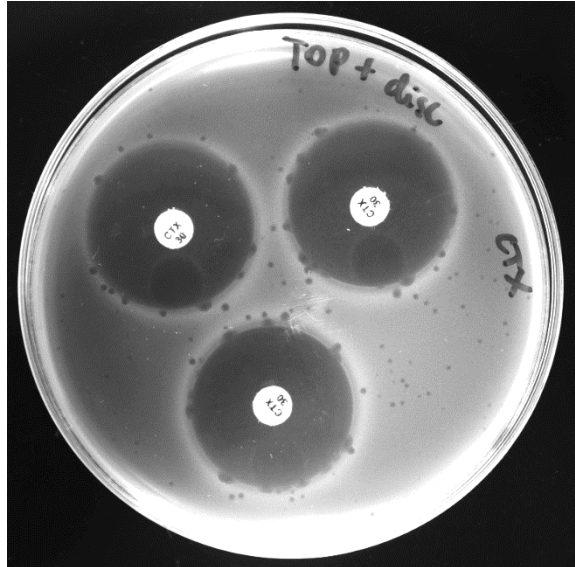
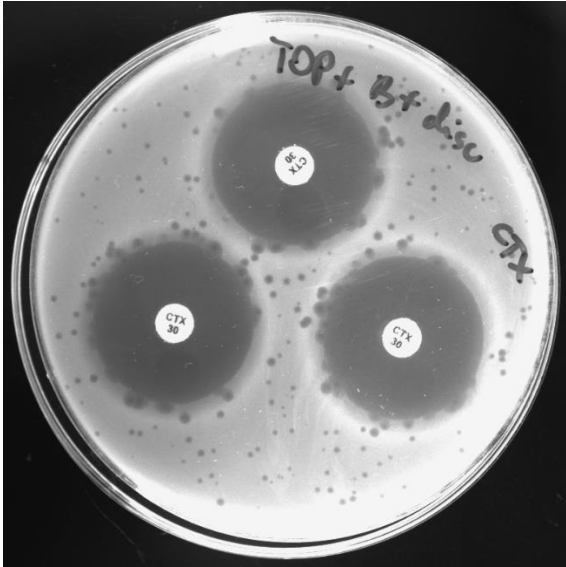


Figure S1. Photographs visualizing plaque sizes and arrangement with the use of ampicillin in different variables of the DLA method.



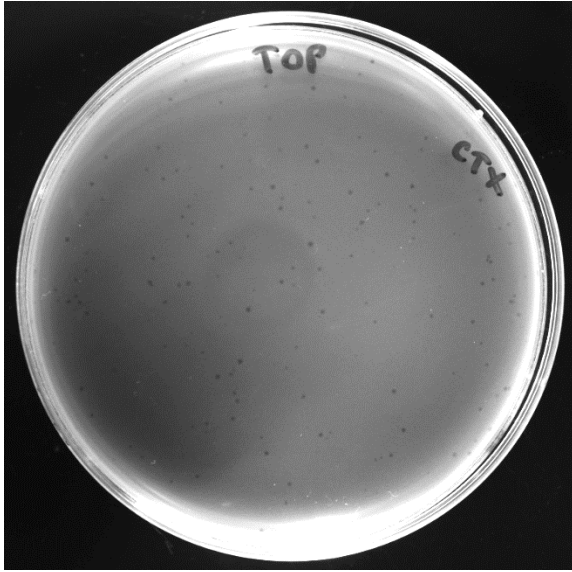


Figure S2 Photographs visualizing plaque sizes and arrangement with the use of cefotaxime in different variables of the DLA method.

Supplementary Materials

Nanoparticles influence lytic phage T4-like performance *in vitro*

Xymena Stachurska ^{1*}, Krzysztof Cendrowski ², Kamila Pachnowska ^{3,4}, Agnieszka Piegat ⁵, Ewa Mijowska ⁴, Paweł Nawrotek ¹

¹ Department of Microbiology and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Animal Husbandry, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Piastów Avenue 45, 70-311 Szczecin, Poland; pawel.nawrotek@zut.edu.pl

² Faculty of Civil and Environmental Engineering, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Piastów Avenue 50a, 70-311 Szczecin, Poland; krzysztof.cendrowski@zut.edu.pl

³ Department of Horticulture, Faculty of Environmental Management and Agriculture, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Juliusza Słowackiego 17, Szczecin 71-434, Poland; kamila.pachnowska@zut.edu.pl

⁴ Department of Nanomaterials Physicochemistry, Faculty of Chemical Technology and Engineering, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Piastów Avenue 45, 70-311 Szczecin, Poland; ewa.mijowska@zut.edu.pl

⁵ Department of Polymer and Biomaterials Science, Faculty of Chemical Technology and Engineering, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Piastów Avenue 42, 71-065 Szczecin, Poland; agnieszka.pieगत@zut.edu.pl

* corresponding author: xymena.stachurska@zut.edu.pl

X-ray diffraction patterns of synthesized SiO₂-Fe₃O₄-TiO₂ particles

The X-ray diffraction patterns of synthesised SiO₂-Fe₃O₄-TiO₂ particles are presented in the Figure S1. From the presented patterns characteristic peaks were assigned to the magnetite phase of iron oxide (JCPDS no. 65-3107), anatase (ICDD no. 03-065-5714) and rutile (ICDD no. 03-065-1118) phase of titanium dioxide. According to the TEM analysis, particles core is made from iron oxide and titanium dioxide is placed on the thin layer of mesoporous silica and small agglomerates form on the surface of the silica shell. Due to this, the prevailing intensity of the iron oxide over titanium dioxide peaks is in agreement with the TEM analysis of the SiO₂-Fe₃O₄-TiO₂ particles.

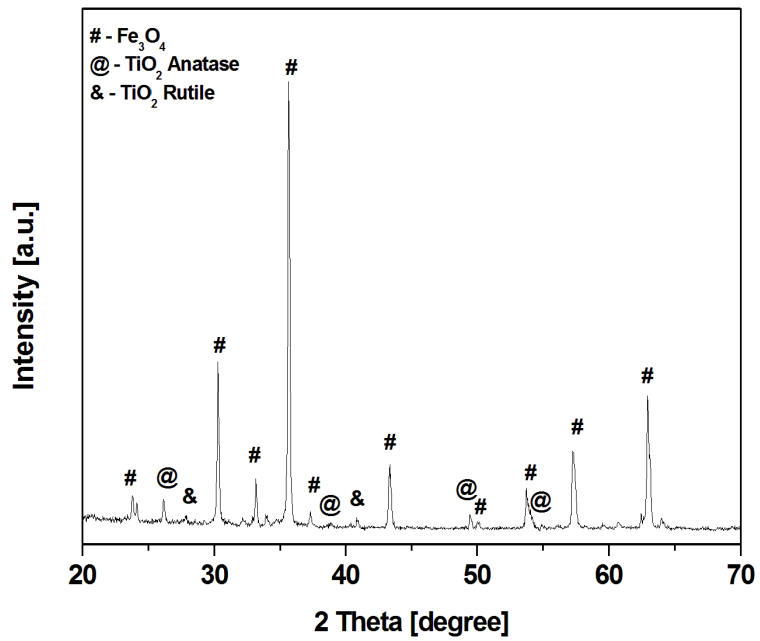


Figure S1. X-ray diffraction spectra of $\text{SiO}_2\text{-Fe}_3\text{O}_4\text{-TiO}_2$ particles with marked peaks corresponding to the Fe_3O_4 and TiO_2 phases.

Exemplary Petri plate from the coincubation test

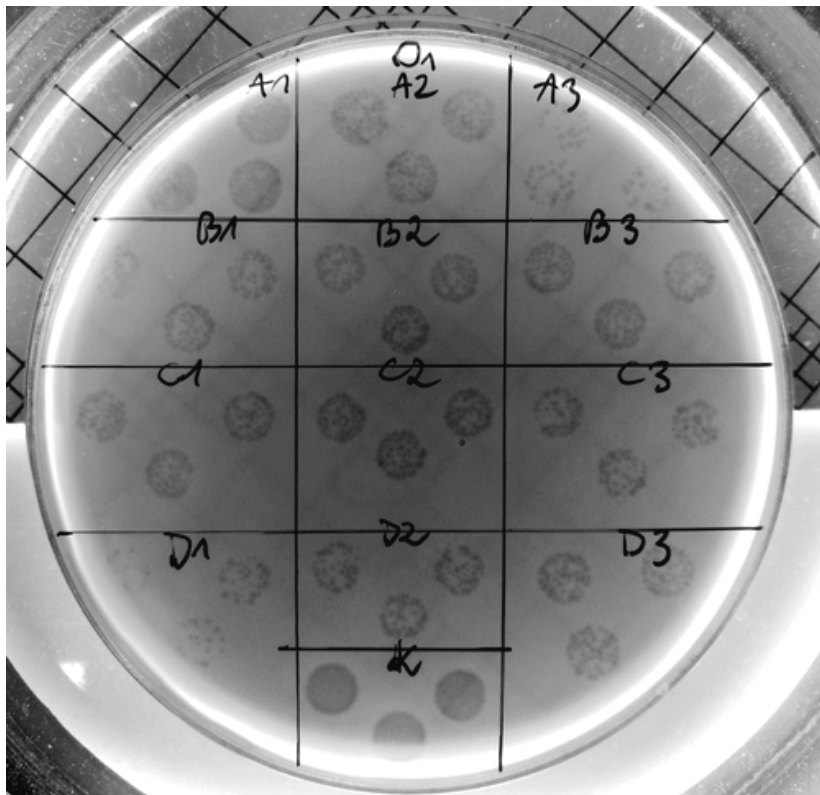


Figure S2. Detailed visualization of the results plate from the coinubation test.

E. coli lysis curves of the tested phage and nanoparticles

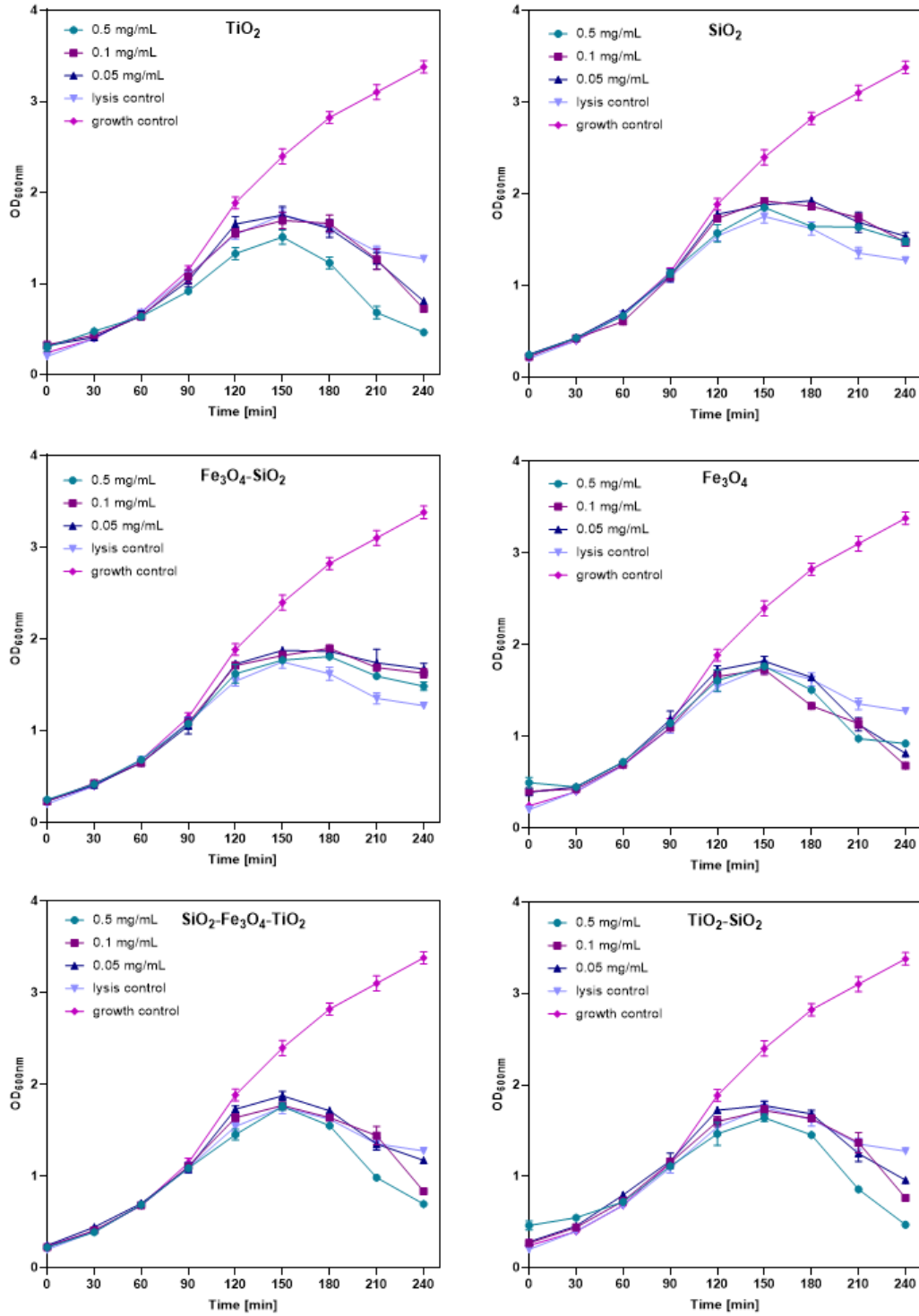


Figure S3. Lysis profile experiments of phage T4s infection in the presence of nanoparticles at different concentrations (0.5, 0.1 and 0.05 mg/mL).

Detailed statistical results of the phage eclipse periods test

Table S1. Dunnett's multiple comparisons test for significance interpretation of the results of progeny phage numbers, from the test of phage eclipse periods after nanoparticles exposure.

Dunnett's multiple comparisons test	Significant?	Summary	Adjusted P Value
0.5 mg/mL			
0 min			
control vs. TiO ₂	No	ns	0,8610
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	No	ns	0,9998
control vs. SiO ₂	No	ns	0,9995
control vs. Fe ₃ O ₄	No	ns	0,9996
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	No	ns	0,9977
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	No	ns	0,9975
2 min			
control vs. TiO ₂	No	ns	0,9997
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	No	ns	>0,9999
control vs. SiO ₂	No	ns	0,8062
control vs. Fe ₃ O ₄	No	ns	0,9975
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	No	ns	>0,9999
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	No	ns	0,9997
4 min			
control vs. TiO ₂	No	ns	0,9996
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	No	ns	0,9996
control vs. SiO ₂	No	ns	0,8279
control vs. Fe ₃ O ₄	No	ns	0,9998
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	No	ns	>0,9999
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	No	ns	>0,9999
6 min			
control vs. TiO ₂	No	ns	>0,9999
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	No	ns	0,9975
control vs. SiO ₂	Yes	**	0,0021
control vs. Fe ₃ O ₄	No	ns	0,9461
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	No	ns	0,9959
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	No	ns	0,9591
8 min			
control vs. TiO ₂	No	ns	0,9619
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	No	ns	0,9959
control vs. SiO ₂	No	ns	0,9309
control vs. Fe ₃ O ₄	No	ns	0,9925
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	No	ns	0,8646
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	No	ns	0,8646
10 min			
control vs. TiO ₂	No	ns	0,7215
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	No	ns	0,3828

control vs. SiO ₂	No	ns	0,9724
control vs. Fe ₃ O ₄	No	ns	0,9933
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	No	ns	0,9882
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	No	ns	0,2317
12 min			
control vs. TiO ₂	Yes	**	0,0040
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. SiO ₂	Yes	*	0,0157
control vs. Fe ₃ O ₄	Yes	**	0,0018
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	Yes	****	<0,0001
14 min			
control vs. TiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. SiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. Fe ₃ O ₄	Yes	****	<0,0001
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	Yes	****	<0,0001
16 min			
control vs. TiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. SiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. Fe ₃ O ₄	Yes	****	<0,0001
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	Yes	****	<0,0001
0.1 mg/mL			
0 min			
control vs. TiO ₂	No	ns	0,9998
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	No	ns	0,9919
control vs. SiO ₂	No	ns	0,9996
control vs. Fe ₃ O ₄	No	ns	0,9996
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	No	ns	0,9997
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	No	ns	0,7349
2 min			
control vs. TiO ₂	No	ns	0,6667
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	No	ns	0,4407
control vs. SiO ₂	No	ns	0,9682
control vs. Fe ₃ O ₄	No	ns	0,9996
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	No	ns	0,8565
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	No	ns	>0,9999
4 min			
control vs. TiO ₂	No	ns	0,9977
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	No	ns	0,3916
control vs. SiO ₂	No	ns	0,4533
control vs. Fe ₃ O ₄	No	ns	0,9998
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	No	ns	0,8112
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	No	ns	0,9958
6 min			
control vs. TiO ₂	No	ns	0,8910
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	No	ns	0,3627

control vs. SiO ₂	No	ns	0,6458
control vs. Fe ₃ O ₄	No	ns	0,9206
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	No	ns	0,5078
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	No	ns	0,9998
8 min			
control vs. TiO ₂	No	ns	0,4158
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	Yes	*	0,0260
control vs. SiO ₂	No	ns	0,4158
control vs. Fe ₃ O ₄	No	ns	0,9059
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	No	ns	0,1263
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	No	ns	0,8530
10 min			
control vs. TiO ₂	No	ns	0,2635
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	No	ns	0,3123
control vs. SiO ₂	No	ns	0,7395
control vs. Fe ₃ O ₄	No	ns	0,9469
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	No	ns	0,2635
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	No	ns	0,7148
12 min			
control vs. TiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	No	ns	0,0875
control vs. SiO ₂	Yes	***	0,0002
control vs. Fe ₃ O ₄	Yes	**	0,0020
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	Yes	****	<0,0001
14 min			
control vs. TiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	No	ns	0,9581
control vs. SiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. Fe ₃ O ₄	Yes	****	<0,0001
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	Yes	****	<0,0001
16 min			
control vs. TiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	Yes	**	0,0016
control vs. SiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. Fe ₃ O ₄	Yes	****	<0,0001
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	Yes	****	<0,0001
0.05 mg/mL			
0 min			
control vs. TiO ₂	No	ns	0,9998
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	No	ns	0,7528
control vs. SiO ₂	No	ns	0,9935
control vs. Fe ₃ O ₄	No	ns	0,9917
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	No	ns	0,9969
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	No	ns	0,8973
2 min			
control vs. TiO ₂	No	ns	0,4734
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	No	ns	0,9998

control vs. SiO ₂	No	ns	0,5806
control vs. Fe ₃ O ₄	No	ns	0,9807
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	No	ns	0,9935
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	No	ns	0,9994
4 min			
control vs. TiO ₂	No	ns	0,9997
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. SiO ₂	No	ns	0,9976
control vs. Fe ₃ O ₄	No	ns	0,9877
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	No	ns	0,9667
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	No	ns	0,9788
6 min			
control vs. TiO ₂	No	ns	0,8987
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	No	ns	0,9797
control vs. SiO ₂	No	ns	0,9976
control vs. Fe ₃ O ₄	No	ns	0,8434
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	No	ns	0,9246
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	No	ns	0,9976
8 min			
control vs. TiO ₂	No	ns	0,8796
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	No	ns	0,7104
control vs. SiO ₂	No	ns	0,8796
control vs. Fe ₃ O ₄	No	ns	0,9979
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	No	ns	0,0762
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	No	ns	0,8796
10 min			
control vs. TiO ₂	No	ns	0,3116
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	Yes	*	0,0133
control vs. SiO ₂	No	ns	0,5007
control vs. Fe ₃ O ₄	No	ns	0,9870
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	No	ns	0,0588
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	No	ns	0,3631
12 min			
control vs. TiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. SiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. Fe ₃ O ₄	Yes	**	0,0045
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	Yes	****	<0,0001
14 min			
control vs. TiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. SiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. Fe ₃ O ₄	Yes	****	<0,0001
control vs. SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -TiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. TiO ₂ -SiO ₂	Yes	****	<0,0001
16 min			
control vs. TiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	Yes	****	<0,0001
control vs. SiO ₂	Yes	****	<0,0001

control vs. Fe₃O₄	Yes	****	<0,0001
control vs. SiO₂-Fe₃O₄-TiO₂	Yes	****	<0,0001
control vs. TiO₂-SiO₂	Yes	****	<0,0001

ns – not significant

Additional TEM images of the phage and nanoparticles physical attachments.

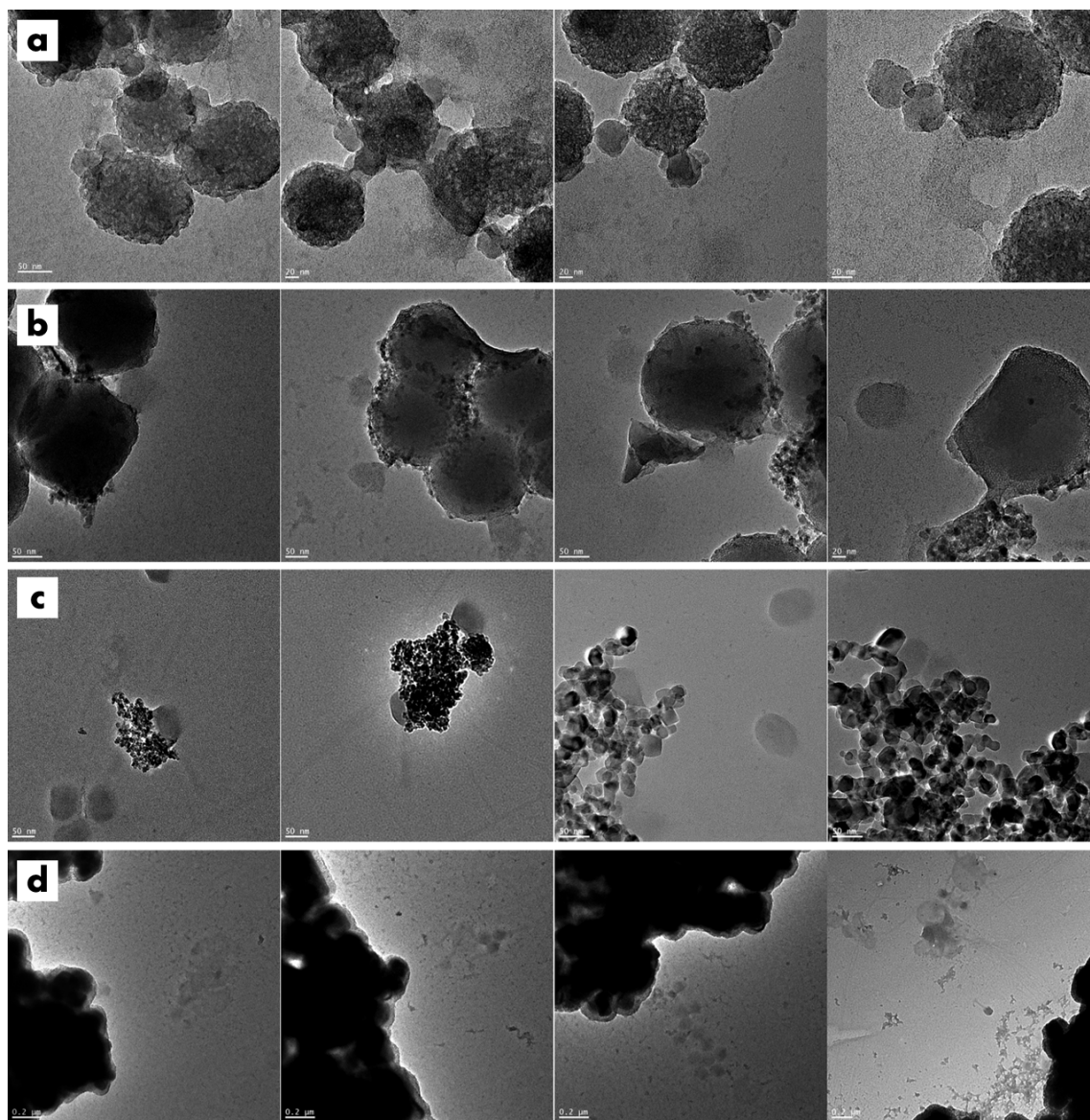


Figure S4. Additional TEM micrographs of phage-nanoparticles interactions (a – d). SiO₂ and phage (a), SiO₂-TiO₂ and phage (b), TiO₂ and phage (c), SiO₂-Fe₃O₄-TiO₂ and phage (d).

CNT-TiO₂ synthesis method and visualization of the interaction with the phage

For additional interactions visualization test, carbon nanotubes functionalized with titanium dioxide and phage was photographed. Firstly, the nanomaterial was synthesized. Carbon nanotubes

were purchased from Shenzhen Nanotech Port Co, (Shenzhen Nanotech Port Co, Shenzhen, China). Nanotubes modified with titanium dioxide (CNT-TiO₂) were prepared by using concentrated titanium (IV) butoxide as a source of titanium dioxide. In order to obtain CNT-TiO₂, 20 mg of CNT previously functionalized with carboxyl groups was added to 1 mL concentrated solution of TBT. Then, the TBT and CNT were sonicated for three hours at the temperature of 50 °C. After sonication, the material was diluted with propanol and centrifuged (8000 rpm for 20 min) to remove the free titanium dioxide precursor. After washing the sample several times with propanol, the material was finally washed with ethanol. The TBT on the carbon nanotubes, exposed to the ethanol hydrolyzed to titanium dioxide. Finally, the sample was heated in airflow at 400 °C for 2 h. Then, according to the method described in the materials and methods section (2.8. *Visualization of phage-nanoparticles interactions*), nanoparticles and phages interactions were visualized (Figure S5). CNT-TiO₂ nanoparticles were also tested for their zeta potential values (40.3 ± 2 [mV]).

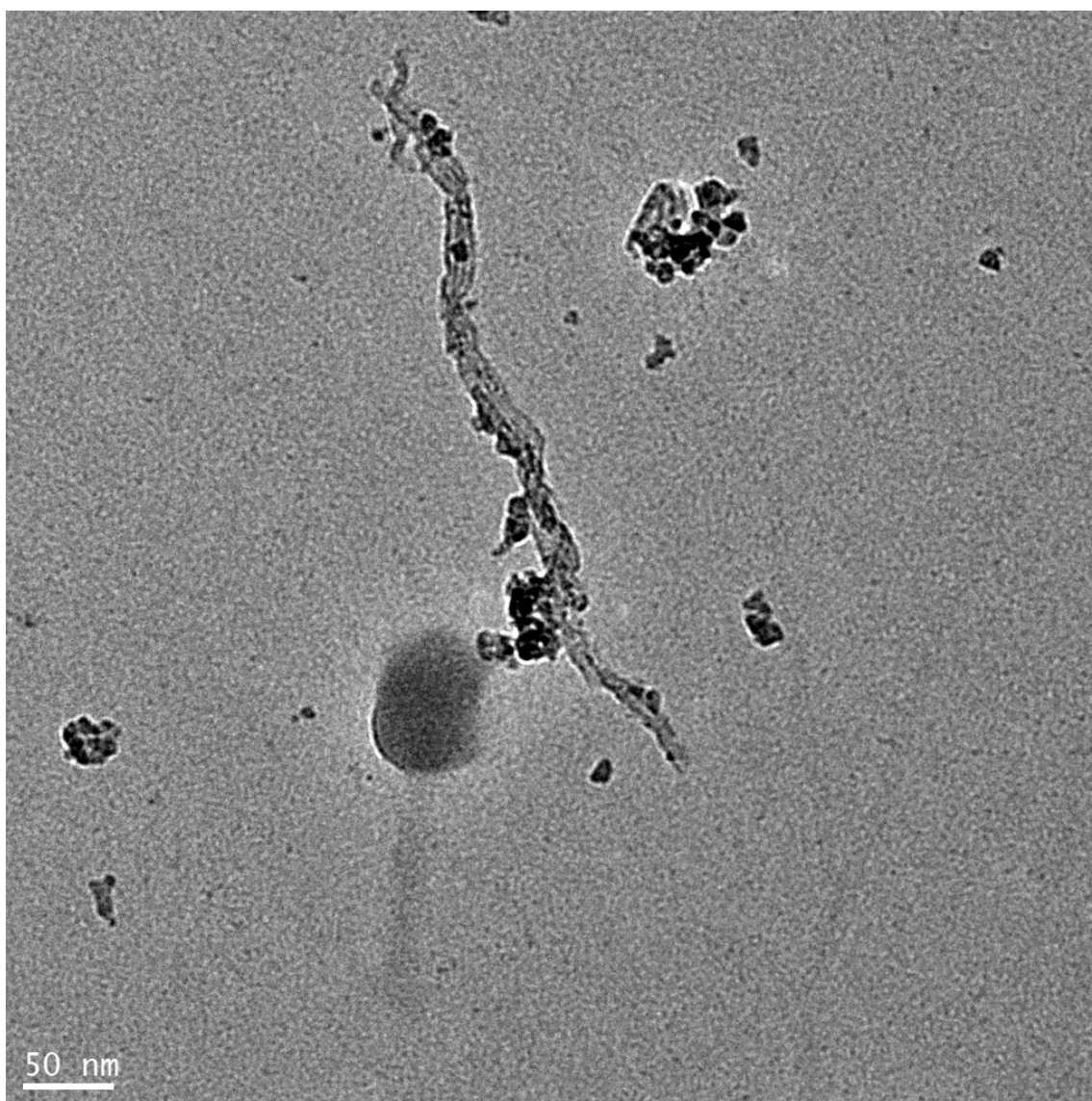


Figure S5. TEM micrograph of CNT-TiO₂ and T4_s phage interaction.

Supplementary materials include: Results from the X-ray diffraction patterns of synthesized $\text{SiO}_2\text{-Fe}_3\text{O}_4\text{-TiO}_2$ particles (Figure S1: X-ray diffraction spectra of $\text{SiO}_2\text{-Fe}_3\text{O}_4\text{-TiO}_2$ particles with marked peaks corresponding to the Fe_3O_4 and TiO_2 phases); Exemplary Petri plate from the coincubation test (Figure S2: Detailed visualization of the results plate from the coincubation test); *E. coli* lysis curves of the tested phage and nanoparticles (Figure S3: Lysis profile experiments of phage T4_s infection in the presence of nanoparticles at different concentrations (0.5, 0.1 and 0.05 mg/mL)); Detailed statistical results of the phage eclipse periods test (Table S1: Dunnett's multiple comparisons test for significance interpretation of the results of progeny phage numbers, from the test of phage eclipse periods after nanoparticles exposure); Additional TEM images of the phage and nanoparticle physical attachments (Figure S4: Additional TEM micrographs of phage–nanoparticle interactions (a–d). SiO_2 and phage (a), $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ and phage (b), TiO_2 and phage (c), $\text{SiO}_2\text{-Fe}_3\text{O}_4\text{-TiO}_2$ and phage (d)); CNT- TiO_2 synthesis method and visualization of the interaction with the phage (Figure S5: TEM micrograph of CNT- TiO_2 and T4_s phage interaction).

Załącznik 3

Oświadczenia współautorów publikacji naukowych wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską wraz z określeniem ich indywidualnego udziału

Xymena Stachurska

Rozprawa doktorska

**WPŁYW WYBRANYCH CZYNNIKÓW PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH NA
AKTYWNOŚĆ BAKTERIOLITYCZNĄ BAKTERIOFAGÓW**

Szczecin, 23.06.2023

dr hab. inż. Paweł Nawrotek, prof. ZUT
Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
al. Piastów 45
70-311 Szczecin

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr inż. Xymeny Stachurskiej:

1. Stachurska, X., Roszak, M., Jabłońska, J., Mizielińska, M., **Nawrotek, P.** (2021) Double-layer agar (DLA) modifications for the first step of the phage-antibiotic synergy (PAS) identification. *Antibiotics*, 10, 1306.
DOI: 10.3390/antibiotics10111306.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w zapewnieniu narzędzi wymaganych do przeprowadzania badań, w tym pozyskanie wsparcia finansowego, konsultacji uzyskanych wyników, pomocy w napisaniu i przygotowaniu manuskryptu oraz nadzór i mentoring nad realizacją działalności badawczej.

2. Stachurska, X., Cendrowski, K., Pachnowska, K., Piegat, A., Mijowska, E., **Nawrotek, P.** (2022) Nanoparticles influence lytic phage T4-like performance *in vitro*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 7179.
DOI: 10.3390/ijms23137179.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, zapewnieniu narzędzi wymaganych do przeprowadzania badań, konsultacji uzyskanych wyników, pomocy w napisaniu i przygotowaniu manuskryptu oraz nadzór i mentoring nad realizacją działalności badawczej.

3. Stachurska, X., Mizielińska, M., Ordon, M., **Nawrotek, P.** (2023) Combinations of echinacea (*Echinacea purpurea*) and rue (*Ruta graveolens*) plant extracts with lytic phages: a study on interactions. *Applied Sciences*, 13, 4575.
DOI: 10.3390/app13074575.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, zapewnieniu narzędzi wymaganych do przeprowadzania badań, w tym pozyskanie

wsparcia finansowego, konsultacji uzyskanych wyników, pomocy w napisaniu i przygotowaniu manuskryptu oraz nadzór i mentoring nad realizacją działalności badawczej.

Podpis współautora



.....
dr hab. inż. Paweł Nawrotek, prof. ZUT

Szczecin, 23.06.2023

prof. dr hab. Ewa Mijowska
Katedra Fizykochemii Nanomateriałów
Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
al. Piastów 45
70-311 Szczecin

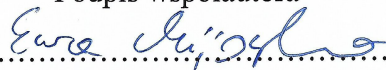
Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr inż. Xymeny Stachurskiej:

1. Stachurska, X., Cendrowski, K., Pachnowska, K., Piegat, A., **Mijowska, E.**, Nawrotek, P. (2022) Nanoparticles influence lytic phage T4-like performance *in vitro*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 7179.
DOI: 10.3390/ijms23137179.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w: zapewnieniu narzędzi wymaganych do przeprowadzania badań, w tym udostępnienie specjalistycznego sprzętu laboratoryjnego, pomocy w napisaniu i przygotowaniu manuskryptu oraz nadzór i mentoring nad realizacją działalności badawczej.

Podpis współautora



.....
prof. dr hab. Ewa Mijowska

Szczecin, 23.06.2023

dr hab. inż. Małgorzata Mizielińska, prof. ZUT
Centrum Bioimmobilizacji i Innowacyjnych Materiałów Opakowaniowych
Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
ul. Klemensa Janickiego 35
71-270 Szczecin

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr inż. Xymeny Stachurskiej:

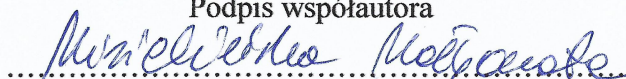
1. Stachurska, X., Roszak, M., Jabłońska, J., **Mizielińska, M.**, Nawrotek, P. (2021) Double-layer agar (DLA) modifications for the first step of the phage-antibiotic synergy (PAS) identification. *Antibiotics*, 10, 1306.
DOI: 10.3390/antibiotics10111306.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w: pozyskaniu wsparcia finansowego, pomocy w napisaniu i przygotowaniu manuskryptu oraz nadzór i mentoring nad realizacją działalności badawczej.

2. Stachurska, X., **Mizielińska, M.**, Ordon, M., Nawrotek, P. (2023) Combinations of echinacea (*Echinacea purpurea*) and rue (*Ruta graveolens*) plant extracts with lytic phages: a study on interactions. *Applied Sciences*, 13, 4575.
DOI: 10.3390/app13074575.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w: opracowaniu metodologii badań, zapewnieniu narzędzi wymaganych do przeprowadzania badań, w tym pozyskanie wsparcia finansowego, pomocy w przygotowaniu ekstraktów roślinnych, pomocy w napisaniu i przygotowaniu manuskryptu oraz nadzór i mentoring nad realizacją działalności badawczej.

Podpis współautora



dr hab. inż. Małgorzata Mizielińska, prof. ZUT

Szczecin, 23.06.2023

dr inż. Krzysztof Cendrowski

Katedra Budownictwa Ogólnego

Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

al. Piastów 50a

70-311 Szczecin

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr inż. Xymeny Stachurskiej:

1. Stachurska, X., **Cendrowski, K.**, Pachnowska, K., Piegat, A., Mijowska, E., Nawrotek, P. (2022) Nanoparticles influence lytic phage T4-like performance *in vitro*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 7179.
DOI: 10.3390/ijms23137179.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, syntezie, charakteryzacji i udoświeczeni nanomateriałów do badań, wykonaniu obrazowania na transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM), konsultacji uzyskanych wyników oraz pomocy w napisaniu i przygotowaniu manuskryptu.

Krzysztof Cendrowski

.....
dr inż. Krzysztof Cendrowski

Szczecin, 23.06.2023

dr inż. Kamila Pachnowska
Katedra Ogrodnictwa
Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
ul. Juliusza Słowackiego 17
71-434 Szczecin

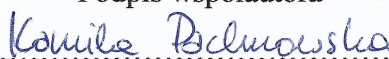
Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr inż. Xymeny Stachurskiej:

1. Stachurska, X., Cendrowski, K., **Pachnowska, K.**, Piegat, A., Mijowska, E., Nawrotek, P. (2022) Nanoparticles influence lytic phage T4-like performance *in vitro*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 7179.
DOI: 10.3390/ijms23137179.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w: zapewnieniu narzędzi wymaganych do przeprowadzania badań, w tym pozyskanie finansowania oraz pomocy w napisaniu i przygotowaniu manuskryptu.

Podpis współautora



.....
dr inż. Kamila Pachnowska

Szczecin, 23.06.2023

dr inż. Agnieszka Piegat
Katedra Inżynierii Polimerów i Biomateriałów
Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
al. Piastów 45
70-311 Szczecin

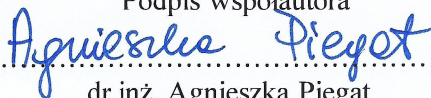
Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr inż. Xymeny Stachurskiej:

1. Stachurska, X., Cendrowski, K., Pachnowska, K., **Piegat, A.**, Mijowska, E., Nawrotek, P. (2022) Nanoparticles influence lytic phage T4-like performance *in vitro*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 7179.
DOI: 10.3390/ijms23137179.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w: zapewnieniu narzędzi wymaganych do przeprowadzania badań, wykonanie pomiarów potencjałów zeta badanych nanomateriałów, oraz pomocy w napisaniu manuskryptu.

Podpis współautora



dr inż. Agnieszka Piegat

Szczecin, 23.06.2023

mgr inż. Marta Gliźniewicz
Zakład Medycyny Laboratoryjnej
Wydział Farmacji, Biotechnologii Medycznej i Medycyny Laboratoryjnej
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
al. Powstańców Wielkopolskich 72
70-111 Szczecin

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr inż. Xymeny Stachurskiej:

1. Stachurska, X., **Roszak, M.**, Jabłońska, J., Mizielińska, M., Nawrotek, P. (2021) Double-layer agar (DLA) modifications for the first step of the phage-antibiotic synergy (PAS) identification. *Antibiotics*, 10, 1306.
DOI: 10.3390/antibiotics10111306.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w: opracowaniu metodologii badań, zapewnieniu powtarzalności wyników oraz pomocy technicznej w przeprowadzaniu eksperymentów.

Podpis współautora



.....
mgr inż. Marta Gliźniewicz

Szczecin, 23.06.2023

mgr inż. Joanna Jabłońska
Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej
Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
al. Piastów 42
71-065 Szczecin

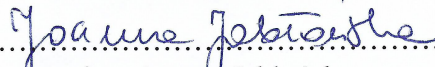
Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr inż. Xymeny Stachurskiej:

1. Stachurska, X., Roszak, M., **Jabłońska, J.**, Mizielińska, M., Nawrotek, P. (2021) Double-layer agar (DLA) modifications for the first step of the phage-antibiotic synergy (PAS) identification. *Antibiotics*, 10, 1306.
DOI: 10.3390/antibiotics10111306.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w: opracowaniu metodologii badań, zapewnieniu powtarzalności wyników oraz pomocy technicznej w przeprowadzaniu eksperymentów.

Podpis współautora

.....

.....

mgr inż. Joanna Jabłońska

Szczecin, 23.06.2023

mgr inż. Magdalena Ordon
Centrum Bioimmobilizacji i Innowacyjnych Materiałów Opakowaniowych
Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
ul. Klemensa Janickiego 35
71-270 Szczecin

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr inż. Xymeny Stachurskiej:

1. Stachurska, X., Mizielińska, M., **Ordon, M.**, Nawrotek, P. (2023) Combinations of echinacea (*Echinacea purpurea*) and rue (*Ruta graveolens*) plant extracts with lytic phages: a study on interactions. *Applied Sciences*, 13, 4575.
DOI: 10.3390/app13074575.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w: pomocy w przygotowaniu ekstraktów roślinnych i pozyskiwaniu danych badawczych (liczenie kolonii bakteryjnych na płytkach Petriego) oraz pomocy w napisaniu i przygotowaniu manuskryptu.

Podpis współautora



.....
mgr inż. Magdalena Ordon

Załącznik 4

Sumaryczne zestawienie dorobku naukowego

Xymena Stachurska

Rozprawa doktorska

**WPLYW WYBRANYCH CZYNNIKÓW PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH NA
AKTYWNOŚĆ BAKTERIOLITYCZNAŁ BAKTERIOFAGÓW**

Prace dyplomowe

1. 10.2012 – 02.2016 - Studia inżynierskie

Kierunek: Biotechnologia

Miejsce realizacji pracy: Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Temat pracy: Ocena aktywności antybakteryjnej i antygrzybiczej olejku eterycznego pozyskanego z macierzanki piaskowej (*Thymus serpyllum* L.).

Praca realizowana pod kierownictwem: dr hab. inż. Pawła Nawrotka, prof. ZUT

2. 02.2016 – 07.2017 - Studia magisterskie

Kierunek: Biotechnologia

Specjalność: Bioinżynieria produkcji żywności

Miejsce realizacji pracy: Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Temat pracy: Ocena potencjału aplikacyjnego bakteriofagów środowiskowych, zaadsorbowanych do powierzchni podkładów absorpcyjnych, wykazujących aktywność bakteriologiczną wobec wybranych bakteryjnych patogenów żywności.

Praca realizowana pod kierownictwem: dr hab. inż. Pawła Nawrotka, prof. ZUT

3. 10.2017 – obecnie - Studia doktorskie

Kierunek: Biotechnologia

Miejsce realizacji pracy: Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Temat pracy: Wpływ wybranych czynników przeciwdrobnoustrojowych na aktywność bakteriologiczną bakteriofagów.

Praca realizowana pod kierownictwem: dr hab. inż. Pawła Nawrotka, prof. ZUT

Publikacje naukowe

a) Publikacje naukowe wchodzące w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską:

1. Stachurska, X., Roszak, M., Jabłońska, J., Mizielińska, M., Nawrotek, P. (2021) Double-layer agar (DLA) modifications for the first step of the phage-antibiotic synergy (PAS) identification. *Antibiotics*, 10, 1306.
DOI: 10.3390/antibiotics10111306

2. **Stachurska, X.**, Cendrowski, K., Pachnowska, K., Piegat, A., Mijowska, E., Nawrotek, P. (2022) Nanoparticles influence lytic phage T4-like performance *in vitro*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 7179.
DOI: 10.3390/ijms23137179

IF₂₀₂₂ – 6,208; 140 pkt. MEiN

3. **Stachurska, X.**, Mizielińska, M., Ordon, M., Nawrotek, P. (2023) Combinations of echinacea (*Echinacea purpurea*) and rue (*Ruta graveolens*) plant extracts with lytic phages: a study on interactions. *Applied Sciences*, 13, 4575.
DOI: 10.3390/app13074575

IF₂₀₂₃ – 2,838; 100 pkt. MEiN

Dodatkowo, jedyna nie opublikowana jeszcze praca znajdująca się obecnie w recenzji, nawiązująca bezpośrednio do tematu niniejszej rozprawy została udostępniona jako preprint w bazie bioRxiv pod adresem:

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.06.27.546765v1>

Stachurska, X., Mizielińska, M., Ordon, M., Nawrotek, P. (2023) The use of plant extracts and bacteriophages as an alternative therapy approach in combating bacterial infections: the study of lytic phages and *Stevia rebaudiana*.
DOI: 10.1101/2023.06.27.546765

b) Pozostałe:

4. Roszak, M., Jabłońska, J., **Stachurska, X.**, Dubrowska, K., Kajdanowicz, J., Gołębiwska, M., Kiepas-Kokot, A., Osińska, B., Augustyniak, A., Karakulska, J. (2021) Development of an autochthonous microbial consortium for enhanced bioremediation of PAH-contaminated soil. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 13469.
DOI: 10.3390/ijms222413469

IF₂₀₂₁ – 6,208; 140 pkt. MEiN

5. Ordon, M., Zdanowicz, M., Nawrotek, P., **Stachurska, X.**, Mizielińska, M. (2021) Polyethylene films containing plant extracts in the polymer matrix as antibacterial and antiviral materials. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 13438.
DOI: 10.3390/ijms222413438

IF₂₀₂₁ – 6,208; 140 pkt. MEiN

6. Ordon, M., Nawrotek, P., **Stachurska, X.**, Schmidt, A., Mizielińska, M. (2021) Mixtures of *Scutellaria baicalensis* and *Glycyrrhiza* L. extracts as antibacterial and antiviral agents in active coatings. *Coatings*, 11, 1438.
DOI: 10.3390/coatings11121438

IF₂₀₂₁ – 3,236; 100 pkt. MEiN

7. Ordon, M., Nawrotek, P., **Stachurska, X.**, Mizielińska, M. (2021) Polyethylene films coated with antibacterial and antiviral layers based on CO₂ extracts of raspberry seeds, of pomegranate seeds and of rosemary. *Coatings*, 11, 1179.
DOI: 10.3390/coatings11101179

IF₂₀₂₁ – 3,236; 100 pkt. MEiN

8. Kazimierska, K., Biel, W., Witkowicz, R., Karakulska, J., **Stachurska, X.** (2021) Evaluation of nutritional value and microbiological safety in commercial dog food. *Vet. Res. Commun.* 45, 111–128.
DOI: 10.1007/s11259-021-09791-6
IF₂₀₂₁ – 2,816; 100 pkt. MEiN
9. Mizielińska, M., Nawrotek, P., **Stachurska, X.**, Ordon, M., Bartkowiak, A. (2021) Packaging covered with antiviral and antibacterial coatings based on ZnO nanoparticles supplemented with geraniol and carvacrol. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 1717.
DOI: 10.3390/ijms22041717
IF₂₀₂₁ – 6,208; 140 pkt. MEiN
10. Pachnowska, K., Cendrowski, K., **Stachurska, X.**, Nawrotek, P., Augustyniak, A., Mijowska, E. (2020) Potential use of silica nanoparticles for the microbial stabilisation of wine: an *in vitro* study using *Oenococcus oeni* as a model. *Foods*, 9, 1338.
DOI: 10.3390/foods9091338
IF₂₀₂₀ – 4,350; 70 pkt. MEiN
11. **Stachurska, X.**, Środa, B., Dubrowska, K., Jabłońska, J., Roszak, M., Karakulska J. (2020) Tolerance of environmental bacteria to heavy metals. *Acta Sci. Pol. Zootech.*, 19(2), 63-74.
DOI: 10.21005/asp.2020.19.2.08
20 pkt. MEiN
12. Nawrotek, P., **Stachurska, X.**, Augustyniak, A. (2020) Potential of using bacteriophages and nanomaterials for eradicating bacterial diseases in animals. *Med. Weter.*, 76(07), 6382-2020.
DOI: 10.21521/mw.6382
IF₂₀₂₀ – 0,383; 20 pkt. MEiN
13. Grygorcewicz, B., Chajęcka-Wierzchowska, W., Augustyniak, A., Wasak, A., **Stachurska, X.**, Nawrotek, P., Dołęgowska, B. (2019) In-milk inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by the environmental lytic bacteriophage ECPS-6. *J. Food. Saf.*, 40(2), e12747.
DOI: 10.1111/jfs.12747
IF₂₀₁₉ – 1,133; 20 pkt. MEiN
14. **Stachurska, X.** (2019) Bactericidal and fungicidal activity of the wild thyme (*Thymus serpyllum*) essential oil. *Folia Pomer. Univ. Technol. Stetin. Agric., Aliment., Pisc., Zootech.*, 350(51)3, 33–44.
DOI: 10.21005/AAPZ2019.51.3.04
10 pkt. MEiN

Łącznie: **48,046 IF, 1170 pkt. MEiN**
h-index: 6 (wg bazy Scopus oraz Web of Science)
liczba cytowań (wyluczając autocytowania): **84**

Patenty i zgłoszenia patentowe

1. Patent: B. Grygorcewicz, A. Wasak, A. Augustyniak, **X. Stachurska**, R. Drozd, P. Nawrotek. Sposób wytwarzania biosensora kolorymetrycznego do detekcji bakterii z gatunku *Escherichia coli* i biosensor kolorymetryczny do detekcji bakterii z gatunku *Escherichia coli*. Numer zgłoszenia: P. 423812, numer prawa wyłącznego: Pat.236550, 2020.
2. Patent: B. Grygorcewicz, A. Augustyniak, **X. Stachurska**. Preparat do zwalczania zakażeń *Streptococcus suis*. Numer zgłoszenia: P.426570, numer prawa wyłącznego: Pat.237005, 2020.
3. Zgłoszenie patentowe: B. Grygorcewicz, **X. Stachurska**. Preparat fagowy przeciwko *Streptococcus canis* i sposób podania. Numer zgłoszenia: P.425418.

Udział w projektach

1. *Opracowanie powłok i granulatów tworzyw sztucznych o przedłużonym działaniu antywirusowym do produkcji materiałów i elementów urządzeń*; okres realizacji: 07.2020-09.2020; projekt badawczo-rozwojowy „Odpowiedzialny społecznie „Proto_lab” realizowany w ramach **Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Zachodniopomorskiego 2014-2020**; Projekt realizowany we współpracy z Centrum Bioimmobilizacji i Innowacyjnych Materiałów Opakowaniowych, ZUT; **wykonawca**.
2. *Opracowanie powłok i granulatów tworzyw sztucznych o przedłużonym działaniu antywirusowym i antybakteryjnym*; okres realizacji: 05.2021-09.2021; projekt badawczo-rozwojowy „Odpowiedzialny społecznie „Proto_lab” realizowany w ramach **Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Zachodniopomorskiego 2014-2020**; Projekt realizowany we współpracy z Centrum Bioimmobilizacji i Innowacyjnych Materiałów Opakowaniowych, ZUT; **wykonawca**.
3. *Wpływ nanomateriałów fotoaktywnych na stabilność mikrobiologiczną i skład chemiczny soku winogronowego i wina*; okres realizacji: 09.2019-02.2021; **Preludium, Narodowe Centrum Nauki, PRELUDIUM 2017/25N/ST5/01222**; projekt realizowany we współpracy z Katedrą Fizykochemii Nanomateriałów, ZUT; **wykonawca**.
4. *Wino bez siarki: innowacyjne technologie w winnicy i winiarni wspierające ograniczenie dodatku siarki do win gronowych*; okres realizacji: 08.2021-10.2021; projekt współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach działania M16 „WSPÓŁPRACA” **Programu Rozwoju Obszarów Wiejskich 2014-2020**, nr ZUT: 518/07-82-9246-22; projekt realizowany we współpracy z Katedrą Ogrodnictwa, ZUT; **wykonawca**.

Udział w konferencjach

1. 20.11.2017, VI Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa Młodzi Naukowcy w Polsce, Poznań, „Ocena aktywności bakteriofagowej podkładów celulozowych impregnowanych bakteriofagami wykazującymi aktywność wobec wybranych patogenów żywności” (referat; **wyróżnienie pracy**).
2. 25.05.2018, III Ogólnopolska Konferencja Nowe Horyzonty w Naukach Przyrodniczych BIOT2018, Poznań, „Zastosowanie bakteriofagów do eradykacji patogenów żywności” (referat, **wyróżnienie pracy**)
3. 06-07.06.2019, IV Interdyscyplinarna Konferencja Nano(&)BioMateriały – NaBioMat2019, Toruń, „Interakcja litycznego bakteriofaga T4 z nanocząstkami o potencjale antybakteryjnym wobec bakterii *E. coli*” (referat).
4. 25-28.06.2019, III Konferencja Doktorantów Nauk Przyrodniczych, Gdańsk, „Możliwości ko-aplikacyjne bakteriofagów litycznych i nanomateriałów” (referat).
5. 11-12.04.2019, International Seminar on Sustainability, Economics and Safety - ISSES 2019, Szczecin, „Preliminary study on the bacterial cell lysis of the T4 bacteriophage in the presence of different nanoparticles” (referat).
6. 07.12.2019, III Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów „BioOrg”, Poznań, „Interakcje bakteriofagów i nanomateriałów o potencjale antybakteryjnym” (referat).
7. 20-22.09.2021, XIV Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Toruń, „Nanometryczny ditlenek tytanu jako potencjalny środek kontroli mikroorganizmów w produkcji wina” (referat).
8. 13-15.09.2021, Graphene and other 2D materials, Wrocław, „Silica nanoparticles for the microbial control of wine in *in vitro* study using *Oenococcus oeni*” (referat).
9. 2.12.2017, II Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów „BioOrg”, Poznań, „Wstępna ocena interakcji nanocząstek z litycznym bakteriofagiem środowiskowym T4-like” (poster).
10. 25.05.2018, International Sopot Youth Conference: Where The World Is Heading, Sopot, „Bactericidal activity of phage-impregnated cellulose membranes against chosen foodborne pathogens” (poster).
11. 9-13.07.2018, Viruses of Microbes 2018, Wrocław, „Eradication of biofilm-forming clinical strains of *P. aeruginosa* by the novel bacteriophage cocktail” (poster).

12. 14.05.2019, IV Szczecińskie Sympozjum Młodych Chemików, Szczecin, „Wpływ wybranych nanocząstek na aktywność lityczną bakteriofaga T4” (poster).
13. 17-19.05.2019, 8th Intercollegiate Biotechnology Symposium „Symbioza”, Warszawa, „Evaluation of the phage-antibiotic synergy (PAS) based on different variables of the double-layer agar (DLA) method” (poster).

Doniesienia konferencyjne

1. 25.05.2018, International Sopot Youth Conference: Where The World Is Heading, Sopot, Laskowska, J., Augustyniak, A., Grygorcewicz, B., **Stachurska, X.**, Nawrotek, P. „Screening and characterisation of *Pseudomonas* spp. from domestic cattle”.
2. 24-25.11.2018, I Ogólnopolska Konferencja "Biotechnologia Niejedno Ma Imię", Poznań, Laskowska, J., **Stachurska, X.**, Karakulska, J. „Alternatywne metody w walce z *Pseudomonas aeruginosa*”.
3. 17-19.05.2019, 8th Intercollegiate Biotechnology Symposium „Symbioza”, Warszawa, Jabłońska, J., Roszak, M., Dubrowska, K., Gołębiwska, M., Kajdanowicz, J., **Stachurska, X.**, Augustyniak, A. „Heavy metal tolerance in bacteria isolated from soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)”.
4. 29.05.2020, Konferencja: środowiskowe i genetyczne uwarunkowania zdrowia ludzi i zwierząt, Szczecin, **Stachurska, X.**, Środa, B., Dubrowska, K., Jabłońska, J., Roszak, M., Karakulska, J. „Wrażliwość bakterii środowiskowych na metale ciężkie”.
5. 18-20.09.2020, IX Kopernikańskie Sympozjum Studentów Nauk Przyrodniczych, Toruń, Dubrowska, K., Jabłońska, J., Gołębiwska, M., Środa, B., **Stachurska, X.** „Izolacja bakterii o potencjale bioremediacyjnym z gleby zanieczyszczonej paliwem lotniczym”.

Rozdziały w monografiach naukowych

1. Grygorcewicz, B., Stachurska, X. (2017) Bakteriofagi jako środek ochrony żywności, *Badania i rozwój młodych naukowców w Polsce – nauki przyrodnicze*, s. 34-39, ISBN 978-83-65362-48-3
2. Stachurska, X., Grygorcewicz, B., Nawrotek, P. (2017) Zastosowanie bakteriofagów do eradykacji patogenów bakteryjnych psów, *Pielęgnacja i żywienie psów – pierwsze warsztaty kynologiczne, ZUT*, s. 48-51, ISBN 978-83-7663-203-2

3. Stachurska, X., Nawrotek, P. (2021) 6. Bakteriofagi jako nanobiomateriał – Charakterystyka i ocena aktywności, *Nanobioinżynieria w praktyce. Wybrane zagadnienia*, Wydawnictwo Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, ISBN: 978-83-7663-321-3

Szkolenia i warsztaty

1. 12.2018 – ukończenie szkolenia „Audytor wewnętrzny systemu zarządzania jakością wg normy ISO 17025:2018” (potwierdzone certyfikatem).
2. 02.2019 – ukończenie szkolenia „Audytor wewnętrzny systemu zarządzania jakością wg normy ISO 9001:2015” (potwierdzone certyfikatem).
3. 12.2019 – uczestnictwo w warsztatach „Mikroskop FTIR” organizowanych przez firmę MEDSON w ramach III Ogólnopolskiego Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów na Politechnice Poznańskiej (potwierdzone certyfikatem).
4. 12.2019 – uczestnictwo w warsztatach „Mikroskop ramanowski” organizowanych przez firmę MEDSON w ramach III Ogólnopolskiego Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów na Politechnice Poznańskiej (potwierdzone certyfikatem).
5. 12.2019 – uczestnictwo w warsztatach „Najnowsze rozwiązania w dziedzinie badań topografii powierzchni metodami optycznymi” zorganizowanych przez firmę Optotom i Politechnikę Poznańską, Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej (potwierdzone certyfikatem).
6. 01.2021 – ukończenie szkolenia w zakresie obsługi cytometru przepływowego wraz z oprzyrządowaniem i oprogramowaniem (BC Accuri™ C6 Plus, BD CSampler™ Plus, BD Accuri C6 Plus Software, BD CSampler Plus Software) zorganizowane przez firmę BD (potwierdzone certyfikatem).

Praktyki i Staże

1. 07.2015 – 08.2015
Praktyka w Laboratorium Higieny Żywności, Laboratorium Żywienia i Przedmiotów Użytku oraz Laboratorium Badań Mikrobiologicznych, Wojewódzkiej Stacji Sanitarno Epidemiologicznej w Szczecinie
2. 08.2016 – 08.2016
Staż w Ogrodzie Dendrologicznym w Przelewicach
3. 02.2018 – 03.2018
Staż w Katedrze Genetyki Molekularnej Bakterii - Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański
4. 07.2018 – 08.2018
Staż w firmie PhageArmour Sp. z o.o.

5. 01.2020 – 09.2020

Staż w Katedrze Fizykochemii Nanomateriałów - Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Inne

1. 01.2017 – obecnie

Członek Studenckiego Koła Naukowego Mikrobiologów w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii ZUT w Szczecinie, prezes Koła w latach 2021-2022 oraz 2022-2023.

2. 01.2018 – obecnie

Członek Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów.

3. Laureatka Stypendium Naukowego Prezydenta Miasta Szczecin dla najzdolniejszych studentów i doktorantów - stypendystka 2021 roku.

4. Wielokrotna laureatka stypendiów ZUT: stypendium Rektora ZUT, stypendium dla najlepszych studentów, a następnie dla najlepszych doktorantów oraz zwiększenia stypendium doktoranckiego z dotacji projakościowej.

5. Wielokrotny udział w prowadzeniu warsztatów naukowych „Licealista w świecie nauki”, „Europejska noc naukowców” oraz innych, organizowanych w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii ZUT.

6. Prowadzenie warsztatów naukowych w ramach działania na rzecz promocji wydziału podczas XXX Barzkowickich Targów Rolnych „AGRO POMERANIA 2017” oraz „Dnia Naukowca 2018” w Zespole Szkół Ponadgimnazjalnych Nr 1, im. Juliusza Słowackiego w Dębnie.

7. Poprowadzenie wykładu na „Festiwalu Nauki 2018” – „Bakteriofagi w ochronie żywności” organizowanego w Centrum Dydaktyczno-Badawczym Nanotechnologii ZUT.