

Warszawa, 18 lipca 2016 r.

Prof. dr hab. Anna Lankoff
Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej
ul. Dorodna 16
03-195 Warszawa

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pana mgr inż. Jakuba Mikiciuka

pt.: Zastosowanie nanocząstek srebra w utrwalaniu żywności z uwzględnieniem ich potencjalnej toksyczności wobec mikroflory przewodu pokarmowego człowieka w badaniach *in vitro*.

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska Pana mgr inż. Jakuba Mikiciuka została przygotowana na Wydziale Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie pod kierunkiem dr hab. Arkadiusza Szterka, prof. Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie.

Rozprawa doktorska została przygotowana według nowych zasad w formie 34-stronicowego autoreferatu, obejmującego streszczenia w języku polskim i angielskim, wprowadzenie w podjętą tematykę, założenia i cele pracy, wybrane wyniki i ich dyskusję, podsumowanie, wnioski i bibliografię oraz zestaw trzech opublikowanych prac, omawiających temat rozprawy. Prace te są spójne tematycznie i zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach z tzw. "listy filadelfijskiej" (Journal of Food Processing and Preservation, Journal of Environmental Science and Health B, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures). Zatem można uznać, że najbardziej istotna część rozprawy została już raz wstępnie zweryfikowana. Całość dopełniają oświadczenia współautorów publikacji, dotyczące wkładu pracy Doktoranta w powstaniu publikacji. Nie ma wątpliwości, że głównym autorem koncepcji przedstawionych badań, wykonawcą części eksperymentalnej, analizy i dyskusji uzyskanych wyników oraz redakcji dwóch prac jest Doktorant (70%). Udział w trzeciej pracy jest mniejszy i wynosi 35 %.

Przedmiotem pracy było określenie możliwości zastosowania nanocząstek srebra w przemyśle spożywczym, z uwzględnieniem ich potencjalnej toksyczności względem mikroflory przewodu pokarmowego człowieka. Problem jest bardzo ciekawy zarówno poznawczo, jak i z punktu widzenia praktycznego wykorzystania uzyskanej wiedzy.

Doktorant postawił sobie trzy zasadnicze cele:

- określenie wrażliwości wybranych drobnoustrojów patogennych wobec nanocząstek srebra,
- określenie wpływu nanocząstek srebra na wzrost wybranych bakterii probiotycznych, wyizolowanych z produktów mlecznych,

- określenie potencjalnej toksyczności nanocząstek srebra wobec wybranych, korzystnych bakterii wyizolowanych z przewodu pokarmowego człowieka.

Punktem wyjścia do badań były niejednoznaczne wyniki, dotyczące związku różnych fizykochemicznych cech nanocząstek srebra z ich efektywnością działania wobec szczepów drobnoustrojów. Doktorant podjął zatem próbę szczegółowej charakterystyki komercyjnie dostępnych nanocząstek srebra w formie koloidalnej, zakupionych od czterech dostawców. Posłużył się zaawansowanymi metodami badawczymi, między innymi transmisyjną mikroskopią elektronową (TEM), skaningową mikroskopią elektronową (SEM), metodą dynamicznego rozproszenia światła (DLS) oraz spektroskopią dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (EDX), które zostały dobrane w sposób adekwatny do postawionych celów badań. Uzyskane wyniki potwierdziły obecność nanocząstek srebra w badanych roztworach koloidalnych i wskazały na obecność innych pierwiastków, pochodzących z reagentów stosowanych podczas syntezy nanocząstek. Niestety, ani w autoreferacie, ani w żadnej z publikacji nie znalazłam informacji na temat wyników analizy jakościowej i ilościowej poszczególnych pierwiastków w badanych preparatach, chociaż zastosowana metoda EDX umożliwia uzyskanie takich danych. Mapy rozkładu pierwiastków i widma masowe nie są zbyt informatywne i nie pozwalają na określenie ewentualnych korelacji między składem pierwiastkowym, a efektywnością działania nanocząstek na drobnoustroje. Brak wyników analizy ilościowej zastanawia tym bardziej, że Doktorant przedstawia wyniki autorów, wskazujące na istotny, antybakteryjny wpływ innych pierwiastków, współwystępujących ze srebrem. Kolejne badania wykazały, że badane nanocząstki srebra miały kształt zbliżony do kulistego, a ich średnica hydrodynamiczna wahała się od 34 nm do 150 nm, w zależności od producenta. Brakuje natomiast informacji dotyczącej średnicy nominalnej badanych nanocząstek. Ta dosyć istotna informacja powinna być podana przez producentów, którzy nie zostali przedstawieni przez Doktoranta w publikacjach i rozprawie. Wartości potencjału zeta wahały się od -22 mV do -29 mV, wskazując na tendencję zawiesiny do stabilizacji. Potwierdzeniem stabilizacji były niskie wartości wskaźnika polidispersyjności, wskazujące na monodispersyjność zawiesiny. Natomiast w kolejnym zdaniu Doktorant stwierdza, że na podstawie badań z użyciem SEM i TEM analizowany materiał był układem polidispersyjnym. Czy zatem był to układ mono- czy polidispersyjny? Byłabym ostrożna w formułowaniu stwierdzeń o dyspersyjności układu na podstawie analizy SEM i TEM, ponieważ metodyka przygotowania preparatów do analiz mikroskopowych może sprzyjać ich aglomeracji.

Kolejnym aspektem rozprawy było zbadanie wpływu nanocząstek srebra na wzrost trzech wzorcowych szczepów patogennych: *Escherichia coli*, *Enterococcus hirae* i *Candida albicans*. Doktorant zastosował metodę dyfuzyjno-krażkową i metodę rozcieńczeniową. Wyniki obydwu metod wykazały zahamowanie wzrostu badanych szczepów patogennych w obecności nanocząstek srebra. Najbardziej wrażliwym okazał się szczep *Enterococcus hirae*, a najbardziej opornym szczep *Candida albicans*. Uzyskane wyniki wykazały jednocześnie, że obserwowany efekt zależał od rodzaju i stężenia zastosowanego roztworu nanocząstek. Wnioskowanie na podstawie przedstawionych

wyników jest dosyć uogólnione, ponieważ zastosowane roztwory nanocząstek nie pozwalały na uwzględnienie całego spektrum dawek/stężeń nanocząstek w odniesieniu do wszystkich rodzajów nanocząstek. Przykładowo, porównanie wpływu różnych rodzajów nanocząstek na wzrost badanych szczepów możliwy był jedynie dla stężenia $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ i dotyczył trzech z czterech rodzajów nanocząstek (S1.2, S.3 i S.4) oraz dla stężenia $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ i dotyczył dwóch z czterech rodzajów nanocząstek (S1.1 i S.2). Podobnie, zbadanie zależności dawka-efekt dla różnych rodzajów nanocząstek możliwe było jedynie dla 1 z czterech rodzajów nanocząstek (S.1, S.1.1. i S.1.2). Opis tabel 2 i 3, w których przedstawiono uzyskane wyniki jest dosyć ogólny, a stwierdzenie: "różnymi oznaczeniami literowymi zaznaczono różnice istotne statystycznie" nie pozwala na dokładną analizę wyników. Doktorant wspomina dalej o możliwym wpływie rozmiaru nanocząstek i ich składu pierwiastkowego na skuteczność hamowania wzrostu drobnoustrojów, ale ani w autoreferacie, ani w publikacjach, nie znalazłam próby uwzględnienia tych parametrów w odniesieniu do zastosowanych nanocząstek. Przecież z analizy DLS wynika, że zastosowane nanocząstki różniły się istotnie wielkością (od 34 nm do 150 nm). Podobna uwaga odnosi się do składu pierwiastkowego.

Następnie, wykorzystując analogicznie metodę dyfuzyjno-krażkową i metodę rozcieńczeniową, Doktorant analizował wpływ nanocząstek srebra na wzrost bakterii probiotycznych *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium* BB-12 i *Sreptococcus thermophilus* ST-Y31, wyizolowanych z dostępnych na rynku jogurtów naturalnych. Uzyskane wyniki wykazały, że zarówno rodzaj drobnoustroju i jego rozcieńczenie, rodzaj nanocząstek srebra i ich stężenie miały istotny wpływ na wzrost bakterii. Na uzyskane wyniki niewątpliwie miała wpływ zastosowana metoda badawcza. Wyniki uzyskane za pomocą metody dyfuzyjno-krażkowej wskazały, że wzrost *Sreptococcus thermophilus* nie został w ogóle zahamowany. Natomiast wyniki uzyskane za pomocą metody rozcieńczeniowej wskazały, że wzrost *Sreptococcus thermophilus* został znacząco zahamowany w porównaniu do wzrostu *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium*. Doktorant słusznie tłumaczy to większym prawdopodobieństwem przemieszczania się zarówno nanocząstek jak i komórek bakteryjnych w płynnym medium. Nie bez znaczenia jest zapewne różna dokładność zastosowanych metod. Szczegółowe wyniki zostały przedstawione w tabelach 4 i 5, jednak podobnie jak poprzednio, ich opis jest dosyć ogólny, zawierający stwierdzenie: "różnymi oznaczeniami literowymi zaznaczono różnice istotne statystycznie".

W ostatniej części pracy Doktorant analizował wpływ nanocząstek srebra na przeżywalność korzystnych bakterii *Lactobacilus sp.*, *Bifidobacterium sp.* i *Peptostreptococcus sp.*, wyizolowanych z przewodu pokarmowego człowieka. Podobnie jak w przypadku doświadczeń dotyczących wpływu nanocząstek srebra na przeżywalność bakterii patogennych i probiotycznych, Doktorant stwierdził, że zahamowanie wzrostu bakterii zależy od rodzaju i stężenia nanocząstek oraz rodzaju drobnoustrojów. Najbardziej opornym okazał się ziarniak *Peptostreptococcus*, co Doktorant tłumaczy wielkością komórek tej bakterii. Szczegółowy opis wyników został przedstawiony w publikacji, jednak

wnioskowanie o wpływie rodzaju i stężenia nanocząstek srebra na wzrost bakterii wyizolowanych z przewodu pokarmowego jest, podobnie jak w przypadku poprzednich doświadczeń, dosyć uogólnione.

Główną konkluzją rozprawy jest stwierdzenie, że zastosowane preparaty nanocząstek srebra hamują w sposób nieselektywny wzrost zarówno drobnoustrojów chorobotwórczych, jak i bakterii probiotycznych oraz korzystnej mikroflory przewodu pokarmowego człowieka. Obserwowany efekt uzależniony jest od stężenia i właściwości fizykochemicznych nanocząstek oraz od rodzaju mikroorganizmów. Nasuwa się natomiast pytanie, czy wielkość efektu działania nanocząstek srebra wobec trzech rodzajów bakterii jest podobny, czy różni się istotnie? Odpowiedź na to pytanie miałoby istotne znaczenie praktyczne przy zastosowaniu nanocząstek w sektorze żywnościowym. Dlatego szkoda, że Doktorant nie uwzględnił w rozprawie takiej podsumowującej analizy porównawczej. Pobieżna analiza, którą przeprowadziłam, pokazała dosyć istotne różnice. Przykładowo, strefy zahamowania wzrostu mikroorganizmów patogennych w obecności nanocząstek srebra S1 o stężeniu $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ wahały się w granicach 8,9 – 23,9 mm. Natomiast strefy zahamowania wzrostu bakterii probiotycznych w obecności tych samych nanocząstek srebra S1 o stężeniu $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ wahały się w granicach 0 – 3 mm.

Podsumowując, w opinii recenzenta cel pracy został sprecyzowany jasno i konkretnie. Treść założeń i rozumowań jest jednoznaczna. Metody badań zostały poprawnie dobrane, a wyniki pracy są generalnie spójne i poszerzają wiedzę na temat wpływu nanocząstek srebra na wzrost drobnoustrojów chorobotwórczych, bakterii probiotycznych oraz korzystnej mikroflory przewodu pokarmowego człowieka. Pewien niedosyt budzi brak pełnego wykorzystania osiągniętych wyników oraz ich zbyt powierzchowna dyskusja.

Powyższe uwagi nie wpływają na moją pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Jakuba Mikiciuka. Oceniając całość recenzowanej rozprawy należy uznać, iż jest ona świadectwem znajomości podjętego przez Doktoranta tematu. Zawartość merytoryczna rozprawy, która została opublikowana w recenzowanych czasopismach, świadczy o dojrzałości naukowej i w pełni uzasadnia ubieganie się o stopień doktora. Rozprawa spełnia ustawowe warunki stawiane pracom doktorskim, zatem wnioskuję do Rady Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie Pana mgr inż. Jakuba Mikiciuka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Anne Lankoff