



Politechnika Łódzka

Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii

Łódź, 13-07-2021r.

Prof. dr hab. inż. Elżbieta Klewicka
Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka
ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Anny Oldak
zatytułowanej „Ocena właściwości przeciwdrobnoustrojowych szczepów bakterii
fermentacji mlekowej wyizolowanych z produktów regionalnych”,
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Danuty Kołożyn-Krajewskiej
i dr hab. Doroty Zielińskiej, prof. SGGW,
w Katedrze Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Instytutu Nauk
o Żywieniu Człowieka, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.**

Ocena formalna pracy

Przedstawiona od oceny rozprawa jest cyklem 3 publikacji powiązanych tematycznie opublikowanych w latach 2017-2019. Publikacje ukazały się w czasopiśmie: BioMed Research International, Probiotics and Antimicrobial Proteins oraz Żywność Nauka Technologia Jakość. Wszystkie publikacje są publikacjami oryginalnymi. Sumaryczny współczynnik oddziaływania *Impact Factor* (IF) tych publikacji to 5,159 a suma punktów wg listy ministerialnej po 31.07.2019 wynosi 160. Przedstawiony cykl publikacji został poprzedzony opisem (dalej zwanym komentarzem), który zawiera: źródła finansowania, wykaz publikacji stanowiących

osiągnięcie naukowe, wstęp, przegląd piśmiennictwa cel pracy, hipotezy badawcze, materiał i metodyka badań, omówienie i dyskusja publikowanych wyników, podsumowanie, stwierdzenia i wnioski, spis piśmiennictwa, załączniki w których dołączono kopie publikacji stanowiących rozprawę doktorską. Wszystkie publikacje są wieloautorskie, a udział doktorantki wg Jej deklaracji wynosi od 50 do 80% co świadczy o dużym wkładzie pracy i zaangażowaniu w powstanie tych prac. Tylko w jednej z tych prac Pani Aleksandra A. Ołdak jest autorem korespondencyjnym.

Ocena merytoryczna pracy

Zjawisko zanieczyszczenia mikrobiologicznego żywności jest dużym problemem w skali światowej. Od wielu lat nieustannie zespoły badawcze na całym świecie podejmują prace nad ograniczeniem transferu mikroorganizmów poprzez żywność, w szczególności chorobotwórczych dla człowieka. Szczególnie niebezpieczne jest zanieczyszczenie żywności mikroorganizmami o niskim poziomie infekcyjnym - 10^3 komórek jak w przypadku szczepów *Listeria* spp. czy shigatoksyniczne *E.coli* (STEC) gdzie wystarczy spożyć z żywnością około 100 komórek. Jednym ze sposobów ochrony żywności jest stosowanie konserwantów chemicznych. Niemniej, wraz ze wzrastającą świadomością konsumentką poszukuje się alternatywnych naturalnych, znacznie lepiej akceptowanych sposobów eliminacji mikroflory niepożądaney z żywności. Jedną z takich metod jest zastosowanie fermentacji mlekowej, a dokładniej bakterii należących do tej dużej grupy lub ich metabolitów. Zatem, podjęta w dysertacji tematyka jest aktualna i wpisuje się w zagadnienia dyscypliny technologia żywności i żywienia.

Celem przedstawionej do oceny pracy była charakterystyka aktywności antagonistycznej wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej, wyizolowanych z tradycyjnej żywności fermentowanej oraz oszacowanie możliwości zastosowania wybranych szczepów bakterii do biokonserwacji żywności.

W pierwszej pracy zatytułowanej „Comparison of antibacterial activity *Lactobacillus plantarum* strains isolated from two different kinds of regional cheeses from Poland: oscypek and koryciński cheese” celem była ocena właściwości przeciwdrobnoustrojowych szczepów *Lactobacillus plantarum* (obecnie *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum*) wyizolowanych z dwóch różnych typów serów regionalnych produkowanych w różnych regionach Polski oraz ocena ich potencjału antagonistycznego. Spośród 87 izolatów pozyskanych z wyżej wymienionych próbek

serów, 29 szczepów zidentyfikowano jako *Lactobacillus plantatum*. Dodatkowo, do badań porównawczych dołączono szczep o udokumentowanych właściwościach probiotycznych *Lactobacillus plantatum* 299v. Aktywność antagonistyczną pozyskanych izolatów przeprowadzono w stosunku do 3 szczepów *Listeria monocytogenes* z kolekcji ATCC, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *E.coli* ATCC 10536 oraz dwóch izolatów z żywności: *Bacillus subtilis* oraz *Enterococcus faecium*. Aktywność antagonistyczną bakterii *Lactobacillus plantarum* badano w 3 wariantach: ciecz po hodowli zawierająca żywe komórki bakterii (WBC), supernatant po hodowli pozbawiany żywych komórek bakterii (CFS) oraz supernatant po hodowli pozbawiany żywych komórek bakterii poddany neutralizacji i działaniu enzymu katalazy. Analizując wyniki aktywności antagonistycznej badań przedstawionych na wykresie 1 (typu „heat map” mapa ciepła) można stwierdzić, że najbardziej efektywne w ograniczaniu wzrostu mikroorganizmów testowych okazały się preparaty po hodowli zawierające, żywe komórki bakterii fermentacji mlekowej (WBC). W komentarzu na stronie 42 Autorka pracy twierdzi, że za efekt ten może być odpowiedzialna możliwość dalszego prowadzenia metabolizmu przez bakterie. W dalszym opisie na tej samej stronie Autorka przypuszcza w oparciu o porównanie aktywności antagonistycznej w CFN, że za utrzymanie aktywności antagonistycznej po neutralizacji filtratów odpowiedzialne mogą być niskocząsteczkowe związki aktywne np. bakteriocyny czy nadtlenek wodoru. Czy zostały wykonane próby jakościowe na obecność bakteriocyn i nadtlenu wodoru?

Do dalszych badań Doktorantka wytypowała 2 szczepy *L. plantarum* Os4 i Kor 14. Wartościowym elementem tej publikacji jest aktywność antagonistyczna wytypowanych szczepów w mleku. Wiadomo, że testy anatanogistyczne dyfuzyjne mogą być testem przesiewowym w poszukiwaniu czynników wysoce efektywnych. Natomiast w warunkach *in situ* zarówno szczep antagonistyczny jak i testowy mogą zachowywać się w odmienny sposób. Najefektywniej w stosunku do kontroli ograniczany był wzrost *S. Enteritidis* a najsłabsze oddziaływanie bakterii *L.plantarum* zaobserwowano w przypadku *E.coli* i *L. monnocytoenes*. Jest to zjawisko zastanawiające, ponieważ *E.coli* jest dość wrażliwa na obecność bakterii fermentacji mlekowych w środowisku, a w szczególności na ich metabolity. Szkoda, że nie

pokuszone się wykonanie profilu metabolitów syntetyzowanych przez badane bakterie fermentacji mlekowej w mleku i podłożu modelowym. Pozwoliłoby to na wyjaśnienie zaobserwowanego zjawiska.

W drugiej publikacji zatytułowanej „*Lactobacillus plantarum* strains isolated from polish regional cheeses exhibit anti-staphylococcal activity and selected probiotic properties” Doktorantka prezentuje również aktywność antagonistyczną 29 izolatów w tym przypadku do 3 szczepów *Staphylococcus aureus*. Również, pokazuje wybrane cechy probiotyczne wyizolowanych szczepów: profil enzymatyczny, fenotyp antybiotykooporności, przeżywalność w symulowanym przewodzie pokarmowym, adhezję do komórek gruczołka ludzkiego Caco2. Ponadto, wykonano analogiczny test *in situ* w mleku jako matrycy. W tym przypadku Doktorantka również wybrała te same szczepy *L. plantarum* Os4 i Kor 14. Z wykresu 1 prezentowanego w publikacji jako mapa ciepła można wytypować znacznie bardziej efektywne antagonistycznie szczepy *L. plantarum* w stosunku do *S.aureus*, np. izolat oznaczony jako Os1, Os5 czy Os8. Jakie było kryterium wyboru szczepów LAB do testów antagonistycznych w stosunku do gronkowców?

Analizując wyniki eksperymentów *in situ* zarówno w pierwszej jak i drugiej publikacji gdzie infekowano mleko odpowiednimi bakteriami patogennymi dla człowieka na poziomie 100 komórek/ml nasuwa się pytanie: Dlaczego dla wszystkich bakterii stanowiących zanieczyszczenie mleka zastosowano ten sam poziom zanieczyszczenia wiedząc, że mikroorganizmy te mają zróżnicowane poziomy inicjujące chorobę?

W publikacji 2 przedstawiono również profil aktywności enzymatycznej, profil fenotypowy antybiotykooporności oraz możliwość ograniczania adhezji komórek *S.aureus* do linii komórek Caco2 przez wcześniej omawiane warianty płynów po hodowli *L. plantarum*. Najwyższy poziom inhibicji zaobserwowano w przypadku zastosowania cieczy po hodowli zawierającej żywe komórki bakterii fermentacji mlekowej. Natomiast stosując inaktywowane termicznie komórki bakterii fermentacji zaobserwowano najslabszy efekt hamowania adhezji *S.aureus*. Jakie inne czynniki a nie tylko pierwszorzędowe metabolity mogą odpowiedzialne za obserwowany efekt?

Trzecia publikacja wchodząca w skład osiągnięcia zatytułowana „Porównanie aktywności antagonistycznej wykazywanej przez szczepy bakterii fermentacji mlekowej wyizolowane z różnych rodzajów żywności tradycyjnej” jest meta-analizą wyników badań dotyczących aktywności antagonistycznej bakterii fermentacji mlekowej przeprowadzonych w latach 2014-2019 przez zespół badaczy Zakładu Higieny i Zarządzania Jakością Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. W publikacji poszukiwano korelacji i wyznaczników pomiędzy pochodzeniem szczepu (źródło izolacji) a jego potencjałem antagonistycznym. Aktywność antagonistyczną szczepów porównano w obrębie 4 gatunków: *L. palntarum*, *L. fermentum*, *L. brevis* i *Pd. pentosaceus* w stosunku do wymienionych w publikacjach 1 i 2 szczepów patogennych dla człowieka. Kluczowym i najważniejszym wnioskiem wynikającym z wykonanej meta-analizy jest wykazanie, że badane szczepy bakterii fermentacji mlekowej charakteryzowały się zróżnicowanymi właściwościami antagonistycznymi przy czym decydującymi wyróżnikami było źródło pochodzenia (środowisko) oraz przynależność filogenetyczna szczepu.

Z obowiązku recenzenta wynika również ocena redakcji tekstu i poprawności stosowanej nomenklatury mikroorganizmów. W komentarzu do osiągnięcia i w publikacjach przedłożonych jako podstawa do ubiegania się o stopień naukowy doktora Doktorantka nieprawidłowo stosuje zapis nazwy szczepów salmonella. Stosowany w pracy zapis *S. enteritidis* sugeruje że „*enteritidis*” to nazwa gatunkowa szczepu. W przypadku szczepów salmonella wyróżniamy tylko dwa gatunki *S. enterica* i *S. bongori*. Natomiast przytraczone nazwy Enteridis i Typhimurium są serowarami w obrębie gatunku *S. enterica* i poprawny zapis dopuszcza pominięcie nazwy gatunku a wpisanie bezpośrednio nazwy serowaru, wtedy po nazwie rodzajowej serowar wpisujemy dużą literą bez czcionki „italic” np. *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*). W komentarzu załączonym do publikacji znajdują się również liczne błędy literowe i edytorskie. Niemniej nie wpływają one na merytoryczną i pozytywną ocenę całokształtu osiągnięcia.

Postawiony cel pracy został w pełni zrealizowany. Podjęta tematyka jest aktualna i niezwykle ważna z punktu widzenia mikrobiologii żywności. Natomiast publikacja będąca meta-analizą wnosi ważne informacje do mikrobiologii

prognostycznej. Uzyskane wyniki oceniam pozytywnie a uwagi krytyczne i pytania zawarte w recenzji mają na celu jedynie wywołanie dyskusji naukowej podczas publicznej obrony.

Wniosek końcowy

Przedstawiony cykl 3 publikacji opatrzony wspólnym tytułem "Ocena właściwości przeciwdrobnoustrojowych szczepów bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z produktów regionalnych hodowli" spełnia wymagania określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Założone cele badawcze zostały zrealizowane, a postawione hipotezy pozytywnie zweryfikowane. Przedstawione w pracy wyniki wpisują się nurt zagadnień badawczych prowadzonych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

W oparciu o powyższe przesłanki wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Aleksandry Anny Ołdak i dopuszczenie Jej do dalszych etapów postępowania.

