

Prof. dr hab. Małgorzata Majcher
Pracownia Badania Związków Lotnych i Aktywnych Sensorycznie
Katedra Technologii Żywności
Pochodzenia Roślinnego
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Poznań, 2023-06-12

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Huberta Iwińskiego pt. „Analiza właściwości przeciwpasożytniczych i przeciwprwotniakowych wybranych ekstraktów ziołowych”, wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Antoniego Szumnego oraz opiekuna pomocniczego dr n. biol. Henryka Różańskiego, na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

1. Wprowadzenie

Oporność mikroorganizmów w hodowli zwierząt stanowi poważny problem zarówno ze względu na zagrożenie dla zdrowia konsumenta jak również ze względu na zanieczyszczenie środowiska. Wynika to między innymi z nadużywania lub niewłaściwego stosowania antybiotyków, które prowadzi do pojawienia się opornych szczepów bakterii. Szereg badań wskazuje na powiązanie rozwoju bakterii antybiotykoopornych z praktyką stosowania antybiotyków jako stymulatorów wzrostu u zwierząt, co w konsekwencji może stanowić poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi. Stosowanie antybiotyków w hodowli zwierząt również budzi obawy, ponieważ może prowadzić do skażenia produktów mięsnych opornymi bakteriami, co utrudnia ich leczenie w przypadku infekcji. Aby rozwiązać ten problem, wiele krajów wdrożyło przepisy i wytyczne mające na celu ograniczenie stosowania antybiotyków w hodowli zwierząt i promowanie odpowiedzialnego zarządzania środkami przeciwdrobnoustrojowymi. Ponadto badane są alternatywne podejścia, takie jak probiotyki, prebiotyki i dodatki paszowe pochodzenia roślinnego, jako potencjalne alternatywy dla antybiotyków w hodowli zwierząt. Szczególną uwagę zwraca się na ekstrakty ziołowe, które mają właściwości antybakteryjne i mogą być stosowane jako zamiennik antybiotyków w paszach dla zwierząt. Między innymi duże nadzieje pokłada się w stosowaniu olejków eterycznych z roślin takich jak oregano, tymianek i lawenda, które mają właściwości przeciwdrobnoustrojowe, i które można stosować jako alternatywę dla antybiotyków. Z tego względu uważam, że zadanie, które postawił przed sobą mgr inż. Hubert Iwiński, a mianowicie opracowanie składu, formulacji i wdrożenie do produkcji preparatów o właściwościach przeciwpasożytniczych i przeciwprwotniaczych opartych na wybranych składnikach pochodzenia roślinnego, jest w pełni uzasadnione zarówno ze względów poznawczych jak i aplikacyjnych.

2. Ogólna charakterystyka ocenianej pracy:

Praca doktorska została zrealizowana w ramach II edycji programu „Doktorat Wdrożeniowy” (MNiSW) we współpracy z firmą AdiFed, w której Doktorant wykonał część badań.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została napisana w formie zbioru 3 publikacji oraz 6 patentów zebranych na stronach 21-124, które stanowią część wynikową rozprawy oraz wdrożenia, które zostało opisane na stronach od 126 do 140. Dysertacja obejmuje 165 stron, na które składają się: streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp teoretyczny, cel, wyniki i dyskusja, w której zawarto kopię 3 publikacji, testy toksyczności oraz zbiór 6 patentów, wdrożenie, wnioski, oświadczenia współautorów publikacji, dorobek naukowy oraz spis literatury. Cytowane piśmiennictwo obejmuje 21 pozycji literaturowych, w tym większość z ostatnich 15 lat co świadczy o dobrym rozeznaniu Doktoranta w aktualnej tematyce badawczej. W układzie pracy zastosowano dość nietypowe podejście, gdzie syntetyczny opis wyników znajduje się jedynie w streszczeniu a w opinii recenzentki można było się podjąć nieco szerszego opisu w części dotyczącej wyników i dyskusji. Pewnym ułatwieniem w analizie uzyskanych wyników mógłby być również zamieszczony w pracy schemat przeprowadzonych badań.

We wstępie Doktorant przedstawił skrócony opis problemu stosowania antybiotyków w hodowli zwierząt, definicję i sposoby eliminacji kokcydiozy za pomocą alternatywnych do antybiotyków terapii. Dodatkowo wstęp zawiera informacje na temat firmy AdiFeed ze szczególnym zwróceniem uwagi na doświadczenia pracowników w zakresie wykorzystywania naturalnych roślinnych substancji do produkcji mieszanek paszowych, które polegało na prowadzeniu badań wstępnych z wykorzystaniem ekstraktów z m.in. berberysu zwyczajnego, cząbra ogrodowego, tataraku zwyczajnego, katalpy zwyczajnej, paulowni omszonej, wertycza pospolitego. W badaniach tych określano skład jakościowy ekstraktów (wyniki nie są przedstawione w pracy doktorskiej) oraz ich działanie pierwotniakobójcze (wyniki również nie są dołączone), co w efekcie skłoniło pracowników firmy do podjęcia dalszych badań nad możliwością stworzenia nowych kompozycji przeciwdrobnoustrojowych opartych na olejkach eterycznych pozyskanych innych roślin oraz kwasach organicznych i jonach metali. We wstępie, w ostatnim akapicie zamieszczono część osiągnięć Doktoranta, co jest dosyć nietypowym podejściem. Zwykle wstęp kończy się uzasadnieniem wyboru tematyki badawczej i wyznaczeniem celu pracy. We wstępie wspomniano, że wyniki zostały zamieszczone w 4 publikacjach, jednak przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została napisana w formie zbioru 3 publikacji. Dodatkowo we wstępie pojawia się zdanie: „Zaobserwowano, iż największym potencjałem przeciwdrobnoustrojowym charakteryzowały się ekstrakty pozyskane z roślin zawierające olejki eteryczne i uzyskane z nich destylaty.”, w tym miejscu nasuwa się pytanie, gdzie były wykorzystywane ekstrakty pozyskane z roślin, gdzie destylaty a gdzie komercyjnie dostępne olejki eteryczne?

Podsumowując ogólną charakterystykę pracy, uważam, że rozprawa jest zredagowana poprawnie z niewielką liczbą błędów literowych i stylistycznych, niektóre z obowiązku recenzentki pozwolę sobie

wymienić: str. 14 jest „ilość zgłoszeń” a powinno być „liczba zgłoszeń”, str. 15 jest „ilości incydentów”, powinno być „liczby incydentów” („ilość” – do rzeczowników niepoliczalnych a „liczba” do policzalnych). W publikacji 3 zamieniono stronę 14 i 15 (strona 15 wstawiona jest przed 14), str. 19 jest „właściwości” powinno być „właściwościach”, str. 142. Jest „ efektywność kontekście”, powinno być „efektywność w kontekście”.

3. Ocena merytoryczna pracy

W oparciu o dokonany przegląd piśmiennictwa oraz badania wstępne Doktorant określa cel prac badawczych, którym było opracowanie składu, formulacji oraz wdrożenie do produkcji preparatów o właściwościach przeciwpasożytniczych i przeciwprzywrotniacyjnych opartych na wybranych składnikach pochodzenia roślinnego. Za pewne niedociągnięcie można uznać brak hipotezy badawczej, której postawienie zwykle ułatwia uzyskanie odpowiedzi na pytanie badawcze. Następnie Doktorant określa parametry, które były brane pod uwagę w czasie opracowywania preparatu: skuteczność bójczą wobec pierwotniaków, brak skutków ubocznych dla zwierząt, pozostałości składników aktywnych, w tym zapachowych w mięsie, dostępność komponentów do jego produkcji, powtarzalność składu surowca, cenę jednostkową surowca, prawne aspekty wprowadzania na rynek oraz stabilność otrzymanych formulacji.

Część doświadczalną pracy stanowią trzy publikacje pochodzące z lat 2022-2023, w których Doktorant jest pierwszym i korespondencyjnym autorem, co zasługuje na pozytywną uwagę. Prace zostały opublikowane w czasopismach znajdujących się na liście JCR, a ich sumaryczny współczynnik Impact Factor wynosi 15,371. Wcześniejsza publikacja wyników oznacza, że ich wartość naukowa została zweryfikowana przez recenzentów w/w czasopism. Do części wynikowej rozprawy doktorskiej należą również testy toksyczności oraz patenty (6 sztuk) zebrane na 33 stronach.

Pierwsza z załączonych publikacji (Antibiotocs, z 2022 roku) dotyczyła określenia działania przeciwprzywrotniowego 48 mikstur zawierających w różnych układach ilościowych kombinację olejków eterycznych, kwasów organicznych oraz jonów metali takich jak mangan, cynk i miedź. Uzyskane wyniki wskazały, że najwyższą skutecznością wobec modelowych pierwotniaków (*Euglena gracilis*, *Gregarina blattarum*, *Amoeba proteus*, *Paramecium caudatum* oraz *Pentatrichomonas hominis*) cechowały się formułacje zawierające olejek z drzewa herbacianego oraz cedru w połączeniu z kwasami organicznymi oraz jonami manganu i cynku. Wyniki te uważam za cenne od strony aplikacyjnej jako możliwość potencjalnego zastosowania opracowanych mieszanin do hamowania rozwoju pierwotniaków. Jednocześnie, wykorzystując zaawansowane technik GC/MS, Doktorant określił skład poszczególnych olejków eterycznych, wykazując się umiejętnościami analitycznymi. W tej części pracy nasuwają mi się następujące pytania:

- Ponieważ skład jakościowy i ilościowy olejków eterycznych zależy od wielu czynników (m.in. miejsca uprawy, odmiany) powstaje pytanie czy w pracy badano stabilność składu zakupionych olejków? Czy według Doktoranta jest to problem i czy można go rozwiązać chociażby poprzez monitoring za pomocą analizy GC/MS, GC/FID lub ewentualnie stosowanie własnych olejków uzyskanych bezpośrednio w firmie?
- W analizie ilościowej GC/MS wykorzystano standard wewnętrzny, proszę podać jaki.
- Czy dodatek silnie pachnących olejków eterycznych do paszy może wpływać na zwiększenie lub zmniejszenie apetytu karmionych zwierząt?

Podobny do pierwszej publikacji schemat zastosowano w trzeciej publikacji (Molecules, 2023) gdzie analizowano skuteczność przeciwprzewrotniakowego działania formułacji zawierających olejek goździkowy, cynamonowy, rozmarynowy i czosnkowy w połączeniu z jonami metali oraz kwasami organicznymi. Uzyskane wyniki wskazały, że najefektywniejsze wobec modelowych pierwotniaków były mieszaniny zawierające olejek goździkowy lub rozmarynowy. Ponownie stwierdzono synergistyczny efekt jednoczesnego zastosowania olejków eterycznych, jonów metali oraz kwasów organicznych na zwiększenie działania przeciwprzewrotniakowego. Ponieważ zastosowano kombinację trzech kwasów: mlekowego, octowego oraz propionowego, pojawiło się pytanie:

- Czy na podstawie przeprowadzonych badań można uznać, że uzyskany efekt jest wynikiem jednoczesnego działania dodatku wszystkich trzech kwasów czy też może jeden z nich by wystarczył? Dodatkowo w niniejszej publikacji przedstawiono wyniki potwierdzające brak cytotoksyczności otrzymanych formułacji oraz zaproponowano nowatorskie rozwiązanie określenia składu olejku eterycznego z czosnku za pomocą analizy NMR co świadczy również o swoistych umiejętnościach analitycznych Doktoranta.

Trzecia publikacja prezentuje nieco odmienne wyniki, mianowicie skupia się na badaniach związanych z zastosowaniem mieszaniny składającej się pojedynczych terpenów: salicylanu metylu, 1,8-cyneolu, trans-anetolu, tymolu, mentolu, linalolu oraz p-cymenu do określenia skuteczności działania bójczego wobec wybranych gatunków z rodzaju *Sallomonella*. Wyniki uzyskane przez Doktoranta wskazują na wysoką skuteczność bójczą opracowanej mieszaniny wobec zarówno wyizolowanych z zainfekowanych brojlerów kurzych szczepów *Sallomonelli* jak i szczepów referencyjnych. Ponieważ mieszaninę stworzono mieszając w równoważnych stężeniach 7 poszczególnych związków, proszę o wyjaśnienie:

- Dlaczego te konkretne związki zostały wybrane?
- Czy w opinii Doktoranta lepiej stosować mieszaninę czystych związków czy jednak lepiej stosować ekstrahowane z roślin olejki eteryczne?

Wyniki badań podsumowane są sześcioma wnioskami będącymi odpowiedzią na przedstawiony w pracy cel oraz zadania badawcze. Doktorant stwierdza w pierwszym wniosku, że najbardziej

efektywne okazały się połączenia olejków eterycznych goździkowego, cytrynowego oraz cedrowego, brakuje tu jednak informacji w stosunku do czego były te mieszaniny efektywne, co pewnie można tłumaczyć zastosowaniem skrótu myślowego. Drugi wniosek podsumowuje przeciwpierwotniacze działanie opracowanych fitoncycydów w stosunku do określonych grup pierwotniaków (*Euglena gracilis*, *Gregarina blattarum*, *Amoeba proteus*, *Paramecium caudatum* oraz *Pentatrichomonas hominis*) oraz przeciwbakteryjne działanie w stosunku do szczepów *Salmonella spp.* oraz *Escherichia coli*. Trzeci wniosek wskazuje na potencjalne działanie przeciwnowotworowe opracowanych mieszanin, przy jednoczesnej niskiej cytotoksyczności wobec zdrowych komórek. Przy tym wniosku brakuje informacji, których mieszanin dotyczy niniejsze stwierdzenie. W czwartym wniosku odniesiono się do badań *in vivo* prowadzonych na brojlerach kurzych, które wykazały brak negatywnego wpływu (tu ponownie przydałaby się informacja czego) na organy wewnętrzne i parametry produkcyjne. Dodatkowo zaznaczono, że składowe produktu, jak i potencjalne metabolity nie akumulują się w mięśniu piersiowym, mięśniu udowym, tłuszczu okołojelitowym czy też wątrobie. Tu poproszę o krótkie wyjaśnienie, na podstawie których badań sformułowano niniejszy wniosek? Ostatnie dwa wnioski (5 i 6) odnoszą się do stworzenia technologii produkcji, opracowania metody standaryzacji oraz wdrożenia trzech preparatów o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych przeprowadzonego w firmie AdiFeed, które jest efektem współpracy z UP we Wrocławiu. We wniosku 6 proszę o wyjaśnienie, czy rzeczywiście „skuteczność opracowanych i wdrożonych produktów” można potwierdzić na podstawie rosnącej produkcji, a w konsekwencji sprzedaży?

4. Podsumowanie

W podsumowaniu recenzji stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Huberta Iwańskiego pt. „Analiza właściwości przeciwpasożytniczych i przeciwpierwotniakowych wybranych ekstraktów ziołowych”, wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Antoniego Szumnego oraz opiekuna pomocniczego dr n. biol. Henryka Różańskiego, jest opracowaniem wartościowym i oryginalnym, jednocześnie łączy aspekty naukowe z praktycznymi stanowiąc istotny wkład w dyscyplinę technologii żywnością i żywienia. Zawarte w trzech publikacjach wyniki badań poszerzają wiedzę naukową z zakresu wykorzystania naturalnych substancji do hamowania rozwoju drobnoustrojów oraz wskazują na szerokie umiejętności analityczne Doktoranta zarówno z zakresu badań toksyczności jak również analiz sprzężonych tj. GC/MS. Rezultatem praktycznego podejścia Doktoranta do uzyskanych wyników badań było powstanie 6 zgłoszeń patentowych, w których zdefiniowano skład mieszanin opartych na olejkach eterycznych, kwasach organicznych i jonach metali oraz określono zastosowanie do zapobiegania i/lub leczenia chorób wywołanych przez pierwotniaki. Końcowym efektem doktoratu było wprowadzenie do produkcji w firmie AdiFeed Sp. z o.o. serii preparatów takich jak adiBiotic®,

naturBiotic®, adiNext® bazujących na mieszaninach naturalnych fitoncydów, opracowanych w części doświadczalnej niniejszego doktoratu. Do przekazanej do recenzji pracy włączony został także dorobek naukowy Doktoranta, na który składa się 5 publikacji, 6 monografii oraz informacja o wystąpieniach i posterach prezentowanych na konferencjach naukowych. Wymienione przeze mnie pytania i uwagi mają charakter dyskusyjny, i nie umniejszają wartości naukowej i aplikacyjnej pracy. Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim i wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Technologii Żywności i Żywnienia Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr inż. Huberta Iwańskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.