



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY

Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności.

Gdańsk, 13.10.2023 r.

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Justyny Nasiłowskiej

pt.: „Stan fizjologiczny wybranych patogenów w sokach z warzyw korzeniowych po procesie utrwalania
wysokim ciśnieniem”

wykonanej w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. Wacława Dąbrowskiego

– Państwowym Instytucie Badawczym w Warszawie

pod kierunkiem dr hab. Barbary Sokołowskiej, prof. IBPRS-PIB

Podstawą opracowania recenzji jest Uchwała Rady Naukowej Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Profesora Wacława Dąbrowskiego – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie z dnia 27.09.2018 r.

Wysokociśnieniowe przetwarzanie/utrwalanie (ang. High Pressure Processing, HPP) żywności jest już od ponad 30 lat z powodzeniem stosowane w wielu branżach przemysłu spożywczego na całym świecie. Traktowanie produktów żywnościowych ciśnieniem od 400 do 600 MPa przez 2-3 minuty działa jak proces pasteryzacji, gdyż pozwala na skuteczną inaktywację wegetatywnej mikroflory i patogenów do poziomu istotnego do wydłużenia trwałości żywności i zapewnienia jej bezpieczeństwa. Potwierdzenie skuteczności inaktywacji drobnoustrojów, w tym szczególnie mikroorganizmów chorobotwórczych, w produkcie końcowym opiera się na wynikach badań, które wykonywane są zgodnie z metodami opisanymi w obowiązujących normach. Jeśli zastosowany czynnik przeciwdrobnoustrojowy nie pozwoli na uzyskanie całkowitej inaktywacji, a będzie powodował uszkodzenia subletalne w oznaczanej populacji, to zastosowanie pożywek selektywnych, zalecanych w normach, może dać wynik fałszywie ujemny, co w konsekwencji stwarza zagrożenie zdrowotne dla konsumenta. Dlatego konieczne jest znalezienie nowego podejścia w oznaczaniu patogenów w produktach żywnościowych, które pozwoli na jednoznaczne stwierdzenie, że cała populacja została wyeliminowana (oczywiście w granicach oznaczalności) i w produkcie nie są obecne bakterie subletalnie uszkodzone. Obróbka wysokociśnieniowa może prowadzić do subletalnych uszkodzeń komórek bakteryjnych, które w sprzyjających warunkach po procesie będą mogły ponownie namnażać się. Wpływ wysokiego ciśnienia na zmiany jakie zachodzą w komórkach mikroorganizmów jest złożony i generalnie zależy od warunków paskalizacji oraz od składu chemicznego produktu, pH oraz temperatury przechowywania utrwalanego produktu. Znajomość mechanizmów prowadzących do śmierci komórek po działaniu zwiększonego ciśnienia, jak również znalezienie odpowiedzi na pytanie w jaki sposób mikroorganizmy bronią się w tak ekstremalnych warunkach jest niezbędna, aby umiejętnie zaprojektować parametry ciśnieniowej obróbki jako metody utrwalania żywności.

Wspomniane zagadnienia są podstawą do powstania recenzowanej przeze mnie pracy doktorskiej. Podjęty przez Doktorantkę temat badawczy dotyczący określenia wpływu matrycy i warunków przechowywania na stan fizjologiczny komórek po działaniu wysokiego ciśnienia uważam za aktualny i pożądany.

Ocena formalna pracy

Dysertacja mgr inż. Justyny Nasiłowskiej stanowi spójny tematycznie cykl pięciu publikacji naukowych, opublikowanych w języku angielskim, w recenzowanych czasopismach, w tym 4 z listy Journal Citation Reports (JCR) w latach 2016-2022. Doktorantka jest w każdej publikacji pierwszym autorem, co wskazuje na jej wiodący udział w ich przygotowaniu oraz w realizacji badań. Potwierdzają to także dołączone do dokumentacji oświadczenia współautorów.

W skład tego opracowania wchodzi następujące publikacje:

1. Nasiłowska J., Sokołowska B., Fonberg-Broczek M. (2016). The impact of high hydrostatic pressure in inactivation and sublethal injury of foodborne pathogens in beetroot juice. *Postępy nauki i Technologii Przemysłu Spożywczego*, 71(1), 21–27. (IF₂₀₁₆ (-), pkt. MNiSW: 5)
2. Nasiłowska J., Sokołowska B., Fonberg-Broczek M. (2018). Long term storage of vegetable juices treated by high hydrostatic pressure: Assurance of the microbial safety. *BioMed Research International*, 2. <https://doi.org/10.1155/2018/7389381> (IF₂₀₁₈ – 2,12, pkt. MNiSW: 25)
3. Nasiłowska J., Sokołowska B., Fonberg-Broczek M. (2019). Behavior of *Listeria innocua* strains under pressure treatment – in-activation and sublethal injury. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, 69(1), 45–52. <https://doi.org/10.31883/pjfn-2019-0004> (IF₂₀₁₉ – 2,35, pkt. MEiN: 100)
4. Nasiłowska J., Kocot A., Osuchowska P.N., Sokołowska B. (2021). High-pressure-induced sublethal injuries of food pathogens—microscopic assessment. *Foods*, 10(12), 2940. <https://doi.org/10.3390/foods10122940> (IF₂₀₂₁ – 4,35, pkt. MEiN: 100)
5. Nasiłowska J., Sokołowska B., Fonberg-Broczek M. (2022). *Escherichia coli* and *Listeria innocua* stability in carrot juice preserved by high hydrostatic pressure. *AIMS Agriculture and Food*, 7(3), 623–636. doi: [10.3934/agrfood.2022039](https://doi.org/10.3934/agrfood.2022039) (IF₂₀₂₂ – 1,67, pkt. MEiN: 40)

Sumaryczny Impact Factor wg JCR dla przedstawionych powyżej publikacji wynosi 10,49, a łączna punktacja MEiN (MNiSW) to 270 pkt. Wartości tych wskaźników są odpowiednie przy ubieganiu się o stopień naukowy doktora. Po zapoznaniu się z tymi pracami stwierdzam, że charakteryzują się one wysokim poziomem merytorycznym. Integralną częścią rozprawy pani mgr inż. Justyny Nasiłowskiej jest 67 stronicowe opracowanie zawierające: Streszczenia - w języku polskim i angielskim, oraz omówienie zagadnień związanych z tematyką pracy doktorskiej (Wstęp; Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej; 1. Przegląd piśmiennictwa. 2. Hipotezy i cel pracy; 3. Materiał doświadczalny i metody badań; 4. Osiągnięcia badawcze przedstawione do oceny; 5. Stwierdzenia i wnioski; 6. Bibliografia). Opracowanie zostało poprawnie przygotowane, w logicznej kolejności.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska spełnia więc wszystkie wymogi formalne przy ubieganiu się o stopień naukowy doktora.

Ocena merytoryczna pracy

W pierwszym rozdziale Autorka wprowadza w zagadnienia związane z tematyką dysertacji. Ta część jest syntetycznym przeglądem zagadnień dotyczącym tematu rozprawy, w której w logicznej kolejności przedstawiono poszczególne podrozdziały. Doktorantka krótko opisuje najważniejsze aspekty wpływające na utrwalenie produktów żywnościowych podczas obróbki wysokociśnieniowej i jej wpływ na mikroorganizmy chorobotwórcze oraz powodujące psucie. Charakteryzuje zmiany w komórkach bakterii zachodzące pod wpływem stresu wywołanego poprzez zastosowanie różnych czynników fizycznych i chemicznych, w tym wysokiego ciśnienia. Ta część bezpośrednio wskazuje, że w celu zapewnienia bezpieczeństwa produktu żywnościowego konieczne jest nie tylko poznanie odporności na ciśnienie drobnoustrojów patogennych i powodujących psucie, ale także ich możliwe reakcje fizjologiczne po obróbce wysokociśnieniowej. W tym aspekcie ważne są metody, które stosuje się do oszacowania skuteczności inaktywacji. Doktorantka w kolejnym podrozdziale opisuje metody hodowlane stosowane do oznaczenia liczby komórek subletalnie uszkodzonych w populacji bakterii, a następnie krótko wprowadza w metody mikroskopowe, które pozwalają na dokonanie oceny stanu fizjologicznego komórek. Reasumując, ten fragment pracy dobrze uzasadnia podjęcie badań i sposób ich realizacji.

W kolejnej części opracowania pani Justyna Nasiłowska sformułowała cel pracy i przedstawiła hipotezy badawcze. Opisała materiał badawczy, zastosowane metody i warunki doświadczeń, słusznie ograniczając się do najważniejszych informacji, gdyż ich szczegółowy opis znajduje się w publikacjach wchodzących w skład cyklu tematycznego. Doktorantka w postaci diagramów przedstawiła zaprojektowane logicznie poszczególne etapy postępowania doświadczalnego. W badaniach stosowała po dwa szczepy gramdodatnich bakterii *Listeria innocua* oraz gramujemnych *Escherichia coli*. Stanowią one dobrze dobrane mikroorganizmy modelowe w odniesieniu do bakterii chorobotwórczych występujących w sokach z warzyw korzeniowych.

W wyniku przeprowadzonych analiz Pani Justyna Nasiłowska stwierdziła, że w zależności od wielkości zastosowanego ciśnienia, czasu jego działania oraz właściwości matrycy, w której zawieszono mikroorganizmy bakterie ulegają w różnym stopniu inaktywacji, a w niektórych warunkach po procesie wykrywana jest populacja komórek, które są subletalnie uszkodzone. Największy odsetek komórek subletalnie uszkodzonych powstaje po zastosowaniu ciśnienia 300 MPa przez 5 (*L. innocua* CIP 80.11T) lub 10 minut (pozostałe szczepy), kiedy bakterie zawieszono w soku buraczanym. Natomiast gdy drobnoustroje znajdują się w soku marchwiowym do uzyskania największej liczby komórek uszkodzonych konieczne jest 5-minutowe traktowanie ciśnieniem 400 MPa (dla szczepów *L. innocua*) lub 500 MPa (dla szczepów *E. coli*). Doktorantka sprawdziła także przeżywalność tych bakterii i poziom uszkodzonych komórek w populacji, kiedy traktowane są ciśnieniem po zawieszeniu w buforze McIlvaina o pH 4,0 i 7,0. Potwierdziła, że w środowisku bogatym w składniki odżywcze bakterie przeżywają proces ciśnieniowania w większym stopniu niż w środowisku o minimalnym składzie, jakim był zastosowany bufor. Według Autorki różnice te „prawdopodobnie wynikały z faktu tworzenia warstwy ochronnej wokół komórek bakteryjnych przez związki organiczne”. Czy rzeczywiście taki jest mechanizm ochronny składników żywności na komórki bakterii traktowane zwiększonym ciśnieniem? To zdanie wydaje mi się skrótowo myślowym i wymaga rozwinięcia.

W drugim etapie mgr inż. Justyna Nasiłowska określiła jakie zmiany w morfologii komórek badanych szczepów zawieszonych w buforze PBS (pH 7,2) powoduje obróbka wysokociśnieniowa. Za pomocą nowoczesnych technik mikroskopowych: skaningowej mikroskopii elektronowej, transmisyjnej mikroskopii elektronowej i mikroskopii epifluorescencyjnej określiła charakter zachodzących zmian strukturalnych w komórkach poddanych paskalizacji w odniesieniu do komórek nietraktowanych zwiększonym ciśnieniem. Stwierdziła, że zmiany w morfologii komórek po działaniu wysokiego ciśnienia były zależne od gatunku, a stopień uszkodzenia różni się w zależności od komórki. Uogólniając, zastosowane obrazowanie pozwoliło na stwierdzenie, że w warunkach wysokociśnieniowych komórki tracą swój charakterystyczny kształt i zapadają się. Dochodzi do zmian w organizacji przestrzennej komórek, kondensacji i agregacji cytoplazmy w rejony okołobłonowe i zmiany w nukleoidzie. Autorka podaje, że w komórkach szczepów *E. coli* dochodzi do „znaczącej dezintegracji kwasu nukleinowego”. To sformułowanie jest niezrozumiałe i wymaga wyjaśnienia.

W dalszej części pracy Doktorantka przeprowadziła próby przechowalnicze, gdzie po obróbce wysokociśnieniowej soki, w których zawieszono badane szczepy, przechowywano w temperaturze pokojowej i chłodniczej. Pani Justyna Nasiłowska określiła współczynnik regeneracji i potencjał wzrostu dla każdego mikroorganizmu w specyficznych warunkach. Stwierdziła, że zarówno bakterie *L. innocua* jak i *E. coli* traktowane ciśnieniem w soku marchwiowym mogą naprawiać uszkodzony metabolizm i rozwijać się podczas przechowywania. Natomiast w soku buraczanym liczebność populacji komórek badanych mikroorganizmów ulega zmniejszeniu w tych warunkach. Dodatkowo, Doktorantka sprawdziła czy zastosowanie nowych metod oznaczania liczebności przeżywającej populacji po traktowaniu ciśnieniem będzie bardziej efektywne niż procedury zalecane w normach ISO. Stwierdziła, że stosowanie metody TAL (Thin Agar Layer) może dawać bardziej wiarygodne wyniki oznaczania wszystkich żywych komórek (również tych subletalnie uszkodzonych) po procesie paskalizacji niż standardowe metody, wymagane w ramach obowiązujących norm i rozporządzeń.

W rozdziale *Stwierdzenia i wnioski* pani Justyna Nasiłowska podsumowuje najistotniejsze rezultaty wynikające z przeprowadzonych badań. Najpierw w ogólnym podsumowaniu omawia otrzymane wyniki, a następnie formułuje wnioski i obserwacje. Według mnie znacznie korzystniejsze byłoby przedstawienie wyników w formie uogólnionych syntetycznych wniosków. Po analizie całej dysertacji moje wątpliwości budzi precyzja sformułowania pierwszej hipotezy badawczej. Doktorantka na str. 21 w części *Przeгляд piśmiennictwa* opisuje rodzaje uszkodzeń, które mogą pojawiać się w komórkach bakterii po zastosowaniu czynnika stresowego; są to m.in. zmiana struktur komórkowych, zniszczenie wewnętrznych komponentów itp. Pierwsza hipoteza zakłada, że „*Charakter medium oraz parametry procesu paskalizacji determinują rodzaj indukowanych uszkodzeń w komórkach bakteryjnych w stanie wegetatywnym*”. W ramach przeprowadzonych badań Doktorantka nie sprawdzała jakiego rodzaju zmiany zachodzą w komórkach po procesie paskalizacji w zależności od charakteru medium oraz parametrów procesu, a raczej określała wpływ tych czynników na wielkość powstającej populacji komórek uszkodzonych. Dlatego uważam, że właściwie postawiona hipoteza powinna brzmieć „*Charakter medium oraz parametry procesu paskalizacji determinują poziom/wielkość powstającej populacji komórek subletalnie uszkodzonych*”.

W recenzowanej pracy zauważyłam również nieliczne niedociągnięcia, które zaznaczyłam w tekście recenzowanego egzemplarza rozprawy. Większość z nich podaję poniżej wraz z pytaniami

i komentarzami, które nasunęły mi się podczas czytania tekstu: Na rysunku 2 (str. 21) Doktorantka w obrazowy sposób przedstawiła, jak zmienia się odporność komórek w zależności od intensywności czynnika stresowego. Niestety na przedstawionym schemacie niezrozumiałe jest dla mnie w jaki sposób zdrowa komórka bakteryjna, w optymalnych warunkach wzrostu, staje się komórką przystosowaną do stresu; dalej, (str. 22) Autorka wskazuje także, że uszkodzenia komórek wywołane przez czynniki zewnętrzne można podzielić na trzy grupy. O ile dwie pierwsze są dobrze wyjaśnione, to trzecia nie do końca jest dla mnie jasna, cytuję: *„Trzecim wariantem jest powstawanie uszkodzeń potencjalnie letalnych, które prowadzą do śmierci komórki tylko wtedy, kiedy nie zostanie zatrzymana proliferacja.”* Ułatwieniem w zrozumieniu tego typu uszkodzeń byłoby podanie przykładu uszkodzenia potencjalnie letalnego, który powstaje tylko w komórkach zdolnych do proliferacji i prowadzi do ich śmierci; na str. 30 pojawia się niewłaściwe sformułowanie „.....do uzyskania optymalnej liczby komórek uszkodzonych subletalnie” – czy raczej nie powinno być „.....do uzyskania maksymalnej liczby komórek uszkodzonych subletalnie”; Str. 46 – inaczej powinno być sformułowane zdanie „.....dla większości badanych próbek buforów poziom wywołanych uszkodzeń subletalnych w obrębie tego samego gatunku...” – to zdanie sugeruje, że badane były próbki buforów a nie komórki bakterii zawieszane w buforach; str. 50 – zamiast „....zaobserwowano heterogeniczność populacji bakterii.” powinno być „....zaobserwowano homogeniczność populacji bakterii”; str. 52 – podano nieprawidłową wartość graniczną potencjału wzrostu δ (\leq) 0,05; niefortunne jest określenie – „sok z marchwi przechowywany w temperaturze 5°C promował wzrost szczepów *L. innocua*”. Nadmieniam, że przedstawione powyżej usterki mają charakter formalny. Większość z nich nie pojawia się w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia.

Podsumowując, stwierdzam, że mgr inż. Justyna Nasiłowska stosując umiejętnie zaprojektowane postępowanie doświadczalne oraz racjonalnie dobrane metody pomyślnie zrealizowała zaplanowane zadania badawcze. Uzyskane przez nią rezultaty mają elementy nowości naukowej, a jednocześnie są istotne ze względów praktycznych, które należy wziąć pod uwagę podczas ustalania warunków przemysłowej paskalizacji soków z warzyw korzeniowych.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z *ustawą z dnia 14 marca 2003 r o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami – art. 179 ust. 3 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. – przepisy wprowadzające ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce – D. U. 2018 r. poz. 1669)* i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Profesora Waclawa Dąbrowskiego – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie o przyjęcie pracy i dopuszczenie do dalszych etapów postępowania celem uzyskania stopnia doktora.