



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Chemii
Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii

Surowce naturalne jako źródło nowych rozwiązań antybakteryjnych

Autoreferat

Katarzyna Rafińska

Obszar nauk ścisłych
Dziedzina nauk chemicznych
Dyscyplina chemia

Toruń 2019

Załącznik numer 1

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

1. Imię i nazwisko

Katarzyna Rafińska

2. Posiadane dyplomy i stopnia naukowe

2006–2012 - Studia doktoranckie w zakresie biologii; praca realizowana w Zakładzie Biologii Komórki na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; tytuł rozprawy doktorskiej: „*Udział elementów macierzy zewnątrzkomórkowej w interakcji gametofit męski – zalążek u Larix decidua Mill*”, praca obroniona 29.06.2012 r., promotor: prof. dr hab. Elżbieta Bednarska-Kozakiewicz;

2004–2006 - Studia stacjonarne II stopnia (magisterium) na kierunku biotechnologia; praca realizowana w Zakładzie Biologii Komórki na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; tytuł pracy: „*Dystrybucja i poziom poli(A)RNA w różnicującym się ziarnie pyłku Hyacinthus orientalis L.*”, promotor: prof. dr hab. Elżbieta Bednarska-Kozakiewicz;

2001–2004 - Studia stacjonarne I stopnia (licencjat) na kierunku biotechnologia; praca realizowana w Zakładzie Biologii Komórki na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; tytuł pracy: „*Budowa i funkcje kalretikuliny*”, promotor: prof. dr hab. Elżbieta Bednarska-Kozakiewicz;

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu

01.05.2018 – obecnie	adiunkt naukowy, Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii UMK w Toruniu w wymiarze pół etatu
15.05.2018 – obecnie	chemik, Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydział Chemii UMK w Toruniu w wymiarze pół etatu
01.12.2016 – 30.04.2018	adiunkt naukowy, Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydział Chemii UMK w Toruniu w wymiarze pełnego etatu
01.10.2006 – 30.06.2007	asystent, Zakład Biologii Komórki, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi UMK w Toruniu w wymiarze pełnego etatu

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

(a) tytuł osiągnięcia naukowego:

monotematyczny cykl publikacji zatytułowany:

„Surowce naturalne jako źródło nowych rozwiązań antybakteryjnych”

(b) wykaz powiązanych tematycznie artykułów naukowych stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego:

Publikacje [H1-H9] wchodzące w skład jednotematycznego cyklu prac stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego pochodzą z czasopism znajdujących się na liście Journal Citation Reports (JCR). Jestem autorem do korespondencji w przypadku 3 publikacji [H3, H7, H8]. Dla wszystkich publikacji podałam Impact Factor (IF) odnoszący się do roku wydania publikacji, a także liczbę cytowań Web of Science na dzień 27.02.2019.

IF-impact factor, CI-liczba cytacji Web of Science, PM-punkty MNiSW

[H1] B. Buszewski, V. Railean-Plugaru, P. Pomastowski, **K. Rafińska**, M. Szultka-Młyńska, T. Kowalkowski, „*Antimicrobial effectiveness of synthesized bioactive silver nanoparticles by the Actinomycetes HGG16n strain*”, Curr. Pharm. Biotechnol., 2017, 18(15), 1-9; IF=1,819; CI=2; PM=25

Wkład w autorstwo 65%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literatury, zaplanowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu i wykonaniu analiz dotyczących mikroskopii fluorescencyjnej, udziale w interpretacji wyników dotyczących cytometrii przepływowej oraz mikroskopii fluorescencyjnej, dyskusji uzyskanych wyników, przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu, redakcji całości pracy.

[H2] B. Buszewski, **K. Rafińska**, P. Pomastowski, J. Walczak, A. Rogowska, „*Novel aspects of functionalized silver nanoparticles*”, Colloids Surf. A, 2016, 506, 170–178; IF=2,714; CI=10; PM=30

Wkład w autorstwo 70%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literatury, zaplanowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu i wykonaniu części doświadczalnej dotyczącej sorpcji antybiotyku na biologicznie syntetyzowanych nanocząstkach srebra, analizie właściwości antybakteryjnych, wykonaniu analiz fizykochemicznych, interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu manuskryptu oraz redakcji całości pracy.

Załącznik numer 1

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

[H3] **K. Rafińska**, P. Pomastowski, B. Buszewski „*Study of Bacillus subtilis response to different forms of silver*” Sci. Total Environ. 2019, 661, 120–129; IF=4,610; CI=0; PM=40

Wkład w autorstwo 85%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literatury, zaplanowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu i wykonaniu analiz dotyczących krzywych wzrostu hodowli, poziomu reaktywnych form tlenu, poziomu zredukowanego i straconego srebra oraz obrazowania TEM, dyskusji uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu, redakcji całości pracy, korespondencji z redaktorem czasopisma oraz recenzentami.

[H4] M. Milanowski, P. Pomastowski, V. Railean-Plugaru, **K. Rafińska**, T. Ligor, B. Buszewski „*Biosorption of silver cations onto Lactococcus lactis and Lactobacillus casei isolated from dairy products*”, PLoS One, 2017, 12(3): e0174521; IF=2,766; CI=5; PM=35

Wkład w autorstwo 65%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literatury, zaplanowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu i wykonaniu części doświadczalnej dotyczącej analizy TEM, interpretacji uzyskanych wyników, udziale w napisaniu manuskryptu oraz redakcji pracy.

[H5] P. Pomastowski, M. Sprynskyy, P. Žuvela, **K. Rafińska**, M. Milanowski, J.J. Liu, M. Yi, B. Buszewski, „*Silver-lactoferrin nanocomplexes as a potent antimicrobial agent*”, J. Am. Chem. Soc., 2016, 138, 7899–7909; IF=13,858; CI=13; PM=45

Wkład w autorstwo 50%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literatury dotyczącego oczyszczania laktoferyny, izolacji laktoferyny z serwatki, udziale w analizie aktywności antybakteryjnej uzyskanych kompozytów, analizie TEM, interpretacji uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

[H6] V. Railean-Plugaru, P. Pomastowski, K. Meller, M. Złoch, **K. Rafińska**, B. Buszewski, „*Lactococcus lactis as a safe and inexpensive source of bioactive silver composites*”, J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2017, 101, 7141-7153; IF=3,340; CI=6; PM=35

Wkład w autorstwo 60%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literatury, zaplanowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu i wykonaniu części doświadczalnej dotyczącej analizy cytotoksyczności oraz właściwości antybakteryjnych uzyskanych nanokompozytów, udziale w identyfikacji nowego szczepu bakterii, napisaniu manuskryptu oraz redakcji pracy.

[H7] **K. Rafińska**, P. Pomastowski, J. Rudnicka, A. Krakowska, A. Maruška, M. Narkute, B. Buszewski, “*Effect of solvent and extraction technique on composition and biological activity of Lepidium sativum extracts*”, Food Chem., 2019, 289(15), 16-25; IF=4,946; CI=0, PM=40

Wkład w autorstwo 65%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literatury, zaplanowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu i wykonaniu analiz dotyczących poziomu związków fenolowych oraz flawonoidów w ekstraktach, pomiarów stref zahamowania wzrostu, wartości MIC, pomiaru żywotności L929, obrazowania za pomocą SEM, dyskusji uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu, redakcji całości pracy, korespondencji z redaktorem czasopisma oraz recenzentami.

Załącznik numer 1

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

[H8] O. Wrona, **K. Rafińska**, C. Możeński and B. Buszewski “*Supercritical carbon dioxide extraction of Solidago gigantea Ait.: optimization at quarter-technical scale and scale up the process to halftechnical plant*” Ind. Crops Prod. 2019, 130, 316-324; IF=3,849; C1=0; PM=40

Wkład w autorstwo 65%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literatury, zaplanowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu i wykonaniu analiz dotyczących właściwości antybakteryjnych i cytotoksycznych, analizie zawartości związków fenolowych oraz flawonoidów, interpretacji wyników RSM, dyskusji uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu, redakcji pracy, korespondencji z redaktorem czasopisma oraz recenzentami.

[H9] B. Buszewski, **K. Rafińska**, A. Cvetanovic, J. Walczak, A. Krakowska, J. Rudnicka, Z. Zeković “*Phytochemical analysis and biological activity of Lupinus luteus seeds extracts obtained by supercritical fluid extraction*” Phytochem. Lett. 2019, 30, 338-348; IF=1,575; C1=0; PM=20

Wkład w autorstwo 60%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literatury, zaplanowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu analiz dotyczących oznaczania MIC, żywotności komórek bakteryjnych za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej, cytotoksyczności, dyskusji i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu, redakcji całości pracy.

PODSUMOWANIE

Publikacje [H1-H9] tworzące osiągnięcie habilitacyjne wykazują następujące wskaźniki bibliometryczne:

- sumaryczny współczynnik oddziaływania IF (wg. listy JCR): **39,477**
- średnia wartość IF (wg. listy JCR): **4,39**
- sumaryczna punktacja MNiSW: **310**
- średnia liczba punktów MNiSW: **34,44**
- całkowita liczba cytowań na dzień 27.02.2019 (Web of Science): **36**
- średni udział procentowy: **65%**

Wprowadzenie

W 2004 roku ukończyłam studia licencjackie na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi broniąc pracę zatytułowaną “*Budowa i funkcje kalretikuliny*”. W tym samym roku rozpoczęłam studia magisterskie. Przedmiotem pracy dyplomowej wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Elżbiety Bednarskiej-Kozakiewicz była „*Dystrybucja i poziom poli(A)RNA w różnicującym się ziarnie pyłku Hyacinthus orientalis L.*” Podczas studiów magisterskich zapoznałam się z wieloma technikami biologii molekularnej, m.in. techniką hybrydyzacji *in situ*, która pozwala na zlokalizowanie w komórce nowo powstałych transkryptów. Tytuł magistra uzyskałam w czerwcu 2006 roku. Wyniki mojej pracy ukazały się drukiem w formie publikacji naukowej [1]. Studia doktoranckie kontynuowałam pod kierunkiem prof. dr hab. Elżbiety Bednarskiej-Kozakiewicz w Zakładzie Biologii Komórki. Przedmiotem pracy dyplomowej, było badanie udziału macierzy zewnątrzkomórkowej, w tym pektyn oraz białek arabinogalaktanowych, w oddziaływaniu gametofitu męskiego z załączkiem u rośliny nagonasiennej *Larix decidua* Mill. W badaniach wykorzystywałam techniki biologii molekularnej: reakcje immunocytochemiczne z zastosowaniem przeciwciał

Załącznik numer 1

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

rozpoznających poszczególne składowe ściany komórkowych oraz hodowle *in vitro* łagiewek pyłkowych. W trakcie studiów doktoranckich odbyłam wiele szkoleń, m.in. z zakresu RT-PCR oraz metod biologii molekularnej i obsługi specjalistycznego sprzętu (np. vibrotomu oraz transmisyjnego mikroskopu elektronowego). Wyniki mojej pracy prezentowałam na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Ukazały się także drukiem w formie publikacji naukowych [2–4]. Podczas realizacji doktoratu otrzymałam dwa projekty na finansowanie badań, jednym z nich był grant promotorski nr 304-B Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMK w Toruniu, a drugim “Stypendium dla doktorantów 2008/2009-ZPORR” przyznawane przez Urząd Marszałkowski Województwa Kujawsko-Pomorskiego.

Po uzyskaniu tytułu doktora nauk biologicznych zostałam zatrudniona na stanowisku post-doc w grupie prof. zw. dr hab. Bogusława Buszewskiego, dr h. c. mult., czł. koresp. PAN na Wydziale Chemii UMK w Toruniu. W tym czasie byłam zaangażowana w realizację projektu NCN, Symfonia 1 (2013-2016), nr 2013/08/W/N28/00701 zatytułowanego „Zastosowanie łączonych technik separacyjnych do frakcjonowania nanocząstek i metabolitów o charakterze antybiotycznym wytwarzanych przez promieniowce ze środowisk ekstremalnych”. Celem projektu było opracowanie nowej generacji rozwiązań o charakterze antybakteryjnym z wykorzystaniem nowych szczepów promieniowców. Uzyskane wyniki badań stanowią część prezentowanej rozprawy habilitacyjnej. W międzyczasie byłam zaangażowana w przygotowanie projektu NCBiR zatytułowanego “Rośliny uprawne oraz produkty naturalne jako źródła substancji biologicznie aktywne przeznaczone do produkcji preparatów kosmetycznych, farmaceutycznych i suplementów diety”. Od 2016 roku jestem jednym z jego głównych wykonawców (BIOSTRATEG 2/298205/9/NCBR/2016). W ramach tego projektu współpracuję z Instytutem Nowych Syntezy Chemicznych w Puławach, biorąc udział w planowaniu i optymalizacji ekstrakcji materiału roślinnego płynem w stanie nadkrytycznym oraz badając uzyskany produkt pod kątem właściwości biologicznych. Efektem współpracy są publikacje w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym [5,6].

Po obronie rozprawy doktorskiej byłam zaangażowana w realizację również dwóch innych projektów na Wydziale Chemii UMK w Toruniu. W latach 2014-2015 prowadziłam badania w ramach projektu Sonata zatytułowanego "Synteza i zastosowanie nowych chiralnych soli triazolowych pochodnych terpenów jako N-heterocyklicznych karbenowych prekatalizatorów (NHC) do syntezy asymetrycznej" (2011/03/D/ST5/05626). Natomiast w latach 2015-2018 realizowałam projekt Maestro zatytułowany “Zastosowanie sprzężonych i łączonych technik separacyjnych w badaniach metabolomicznych i poszukiwaniu markerów chorób nowotworowych” (2014/14/A/ST4/00641).

W listopadzie 2018 roku otrzymałam projekt NCN Miniatura pt. “Wpływ struktury oraz kompozycji materiału roślinnego na ekstrakcję wybranych związków biologicznie aktywnych” (2018/02/X/ST4/01351). Celem projektu jest analiza skuteczności trawienia enzymatycznego materiału roślinnego przygotowanego do ekstrakcji. Jest to nowatorskie podejście do procesu ekstrakcji związków biologicznie aktywnych, którego skuteczność została potwierdzona doświadczalnie również w badaniach w których uczestniczę [7]. Podczas realizacji tego interdyscyplinarnego przedsięwzięcia wykorzystuję wiedzę z zakresu biotechnologii jak i chemii analitycznej. W badaniach stosuję barwienia histochemiczne oraz techniki immunocytochemiczne pozwalające zlokalizować oraz ocenić ilość poszczególnych komponentów ścian komórkowych takich jak celuloza, pektyny oraz hemicelulozy.

Od 2018 roku jest współdziałalwcem spółki BioServ, będącej firmą odpryskową typu spin-off, specjalizującej się w opracowywaniu nowych metod syntezy naturalnych biokompozytów o działaniu antybakteryjnym opartych na zastosowaniu metali oraz pozyskiwaniu ekstraktów roślinnych. 9 listopada 2018 roku spółka BioServ otrzymała tytuł Lidera Innowacji Pomorza i Kujaw 2018 za rozwiązanie pod nazwą „Nowej generacji preparat antyseptyczny”.

Obecnie jestem zatrudniona jako adiunkt naukowy w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Jestem promotorem pomocniczym oraz opiekunem rozprawy doktorskiej mgr Anety Krakowskiej zatytułowanej „Techniki nadkrytyczne w pozyskiwaniu oraz oznaczaniu związków o właściwościach antyoksydacyjnych”. W ramach współpracy z Instytutem Nowych Syntez Chemicznych w Puławach sprawuję opiekę naukową nad rozprawą doktorską mgr Olgi Wrony.

Problem lekooporności

Odkrycie antybiotyków na początku XX wieku zahamowało postęp badań nad alternatywnymi środkami o działaniu antybakteryjnym. Nierozważne stosowanie związków o charakterze antybiotycznym doprowadziło do powstania w komórkach bakteryjnych różnych systemów oporności, często obejmujących oporność jednocześnie na wiele stosowanych związków. Oporność bakterii na antybiotyki uważana jest obecnie za główny problem zdrowia publicznego. Strategie zalecane przez Światową Organizację Zdrowia obejmują badania nad nowymi antybiotykami bądź formułacjami antybakteryjnymi. Jednakże od lat 80-tych, kiedy to odkryto daptomycynę oraz linezolid nie wprowadzono nowej generacji antybiotyku, a obecnie komercjalizuje się jedynie nowe skuteczniejsze kombinacje znanych już wcześniej związków [8–10].

W raporcie z Globalnego Systemu Nadzoru nad Opornością na Środki Przeciwdrobnoustrojowe (GLASS) Światowa Organizacja Zdrowia wskazuje, że oporne wobec standardowych antybiotyków szczepy bakterii stwierdzono u 500 tys. pacjentów w 22 krajach [11]. Najczęściej wskazywanymi opornymi bakteriami są obecnie *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* i *Salmonella* spp. Są one czynnikiem patogennym infekcji układu moczowego, zapalenia płuc, ucha oraz infekcji ran. Szczególnie niebezpieczne dla życia ludzkiego są zakażenia krwi powodowane przez te antybiotykooporne szczepy. Wysoki poziom oporności stwierdzono również u *Acinetobacter baumannii* oraz *Pseudomonas aeruginosa*. WHO zakwalifikowało je jako szczepy, na które priorytetowo poszukuje się nowych rozwiązań leczniczych [12]. Stąd w ostatnich latach obserwuje się znaczący wzrost zainteresowania nowymi strategiami oraz rozwiązaniami o charakterze antybakteryjnym opartymi na zastosowaniu naturalnych surowców.

Jednym z współczesnych kierunków badań jest wykorzystanie metali, a w szczególności srebra do opracowania nowych formułacji antybakteryjnych. Ze względu na wysoką toksyczność jonów srebra, coraz powszechniej stosowaną formą tego pierwiastka są nanocząstki. Nanocząstki to cząstki materii nie większe niż 100 nm [13]. Nanocząstki srebra mogą być pozyskiwane metodami chemicznymi lub fizycznymi. W ostatnich latach opracowano również skuteczne protokoły syntezy biologicznej z wykorzystaniem mikroorganizmów lub ekstraktów roślinnych. Pomimo powszechnego stosowania nanocząstek srebra w życiu codziennym, mechanizm ich działania nie został dobrze poznany. Wiele analiz wskazuje, że nanocząstki srebra w środowisku wodnym uwalniają niewielkie ilości Ag^+ i to one odpowiadają za właściwości antybakteryjne. Mogą one oddziaływać z grupami tiolowymi i aminowymi białek, z kwasami nukleinowymi oraz błonami

komórkowymi. Oddziaływanie nanocząstek srebra i uwalnianych z nich jonów może prowadzić do uszkodzenia oraz przerwania ciągłości ścian i błon komórkowych, co skutkuje uwalnianiem zawartości komórek do środowiska zewnętrznego. Obecność jonów srebra prowadzi również do hamowania aktywności enzymów bakteryjnych poprzez wiązanie do grup funkcyjnych ich centrów aktywnych. W wielu przypadkach stwierdzono tworzenie reaktywnych form tlenu, które mogą uszkadzać struktury komórek bakteryjnych [14,15].

Drugim obecnie obowiązującym kierunkiem poszukiwań strategii i formułacji o charakterze antybakteryjnym jest pozyskiwanie związków bioaktywnych z roślin. Rośliny są szczególnie bogatym źródłem metabolitów wtórnych, które nie są niezbędne do ich wzrostu i rozwoju, a odgrywają niezmiernie ważną rolę w oddziaływaniu ze środowiskiem wzrostu. W większości są to związki niskocząsteczkowe, które mogą być ekstrahowane z materiału roślinnego. Do tej pory dobrze udokumentowano działanie antybakteryjne wielu klas związków syntetyzowanych przez rośliny, m.in. polifenoli, flawonoidów, saponin, chalkonów czy tanin. Wykazują one skuteczność przeciw szerokiemu spektrum bakterii gram dodatnich oraz ujemnych. Warto również zaznaczyć, że materiał roślinny stanowi niedrogi surowiec umożliwiający pozyskiwanie preparatów o działaniu antybakteryjnym na dużą skalę.

Ekstrakcja materiału roślinnego stanowi kluczowy etap w pozyskiwaniu związków niskocząsteczkowych o aktywności biologicznej. Istnieje wiele technik izolowania metabolitów wtórnych, różnią się one znacznie w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika, temperatury i ciśnienia. Różnice w strukturze izolowanych związków bioaktywnych determinują ich rozpuszczalność w rozpuszczalnikach o różnej polarności. Dlatego też rodzaj rozpuszczalnika ekstrakcyjnego, jak również technika izolacji (ekstrakcji) mają znaczący wpływ na wydajność pozyskiwania wtórnych metabolitów roślinnych i jednocześnie na aktywność uzyskanych ekstraktów [16,17].

Cel pracy

Głównym celem niniejszych badań było opracowanie nowych formułacji o właściwościach antybakteryjnych z wykorzystaniem szerokiego spektrum surowców naturalnych takich jak środowiskowe szczepy bakterii, białka serwatki oraz materiał roślinny. Otrzymane preparaty miały charakteryzować się wysoką skutecznością, łatwością otrzymywania oraz niską toksycznością wobec prawidłowych komórek. Równoległe drugim celem było poznanie mechanizmów działania wybranych preparatów na komórki bakteryjne.

Produkty otrzymane w toku pracy ze względu na swoją antybakteryjną skuteczność mogą znaleźć zastosowanie w zewnętrznym leczeniu infekcji skóry oraz błon śluzowych. Preparaty roślinne mogą stanowić naturalny dodatek do kosmetyków lub żywności przedłużający ich trwałość, również w kontekście ochrony antyoksydacyjnej.

Dla realizacji powyższych celów podjęto następujące działania:

1. Opracowanie metody oceny właściwości antybakteryjnych biologicznie syntetyzowanych nanocząstek srebra z udziałem promieniowców izolowanych z kwaśnych gleb leśnych z wykorzystaniem nowoczesnych technik biologii molekularnej: cytometrii przepływowej oraz znakowania komórek martwych i żywych za pomocą barwników fluorescencyjnych [H1].
2. Opracowanie metody funkcjonalizacji nanocząstek srebra za pomocą antybiotyku w celu poprawy ich właściwości antybakteryjnych. Ten etap badań obejmował analizę kinetyki wiązania antybiotyku do powierzchni biologicznie syntetyzowanych nanocząstek i analizę fizykochemiczną funkcjonalizowanych nanocząstek [H2].
3. Wyjaśnienie mechanizmu działania jonów srebra, nanocząstek srebra oraz nanocząstek srebra funkcjonalizowanych antybiotykiem na wybrane szczepy bakterii z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) oraz analizy poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) [H3, H4]. W tym etapie badań za pomocą ICP-MS monitorowano również ilość srebra strąconego przez komórki bakteryjne [H3].
4. Opracowanie skutecznej metody syntezy nanokompleksów srebra w oparciu o wykorzystanie produktów pochodzenia mleczarskiego: bakterii kwasu mlekowego oraz laktoferyny izolowanej z serwatki. Celem tego etapu było opracowanie metody oczyszczania laktoferyny z serwatki za pomocą chromatografii jonowymiennej, analiza kinetyki wiązania jonów srebra do laktoferyny oraz ocena właściwości antybakteryjnych uzyskanych kompleksów [H5]. Ponadto podjęto się opracowania metody syntezy nanocząstek srebra z wykorzystaniem bakterii izolowanych z mleka. W tym celu dokonano identyfikacji wyizolowanego szczepu za pomocą MALDI-TOF-MS i sekwencjonowania 16S rDNA oraz opracowano warunki syntezy nanocząstek srebra z wykorzystaniem płynu pohodowlanego [H6].
5. Dobór warunków przygotowania oraz ekstrakcji materiału roślinnego w celu uzyskania produktu o właściwościach antybakteryjnych [H7, H8, H9]. Na tym etapie dokonano wyboru rozpuszczalnika, techniki oraz warunków ekstrakcji wybranego materiału roślinnego. Poziom związków biologicznie aktywnych w uzyskanych ekstraktach był monitorowany za pomocą analiz spektrofotometrycznych oraz HPLC-MS. Dokonano optymalizacji ekstrakcji materiału roślinnego ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym za pomocą metodologii powierzchni odpowiedzi oraz przeniesienia skali ekstrakcji z ćwierćtechnicznej do półtechnicznej [H8, H9].

Podejście interdyscyplinarne zastosowane w pracy oparte na wykorzystaniu spektroskopii, spektrometrii oraz metod biologii molekularnej umożliwiło opracowanie formułacji o wysokim potencjale antybakteryjnym oraz jednocześnie wyjaśnienie mechanizmów ich działania (Tab. 1).

Załącznik numer 1

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Tab. 1. Metodologia zastosowana do opracowania nowych formułacji o właściwościach antybakteryjnych z wykorzystaniem szerokiego spektrum surowców naturalnych.

FORMULACJE ANTYBAKTERYJNE		
SREBRO		MATERIAŁ ROŚLINNY
BIOSYNTeza NANOCZĄSTEK Z WYKORZYSTANIEM PROMIENIOWCÓW		DOBÓR WARUNKÓW HODOWLI ROŚLIN
SYNERGIZM NANOCZĄSTEK Z ANTYBIOTYKAMI		DOBÓR WARUNKÓW EKSTRAKЦИИ
FUNKCJONALIZACJA NANOCZĄSTEK ZA POMOCĄ ANTYBIOTYKÓW		• DOBÓR ROZPUSZCZALNIKA
BIOZYNTeza NANOKOMPLEKSÓW Z WYKORZYSTANIEM BAKTERII KWASU MLEKOWEGO		• DOBÓR TECHNIKI EKSTRAKЦИИ
BIOZYNTeza NANOKOMPLEKSÓW Z WYKORZYSTANIEM LAKTOFERYNY		OPTYMALIZACJA WARUNKÓW EKSTRAKЦИИ
TRANSMISYJNA MIKROSKOPIA ELEKTRONOWA		AKTYWNOŚĆ ANTYOKSYDACYJNA
KINETYKA ADSORPCJI		SPEKTROFOTOMETRYCZNA ANALIZA ZAWARTOŚCI ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH I FLAWONOIDÓW
MIKROANALIZA RENTGENOWSKA		ANALIZA HPLC-MS
FTIR		ANALIZA GC-MS
POTENCJAŁ ZETA		
METODA KRĄŻKOWO-DYFUZYJNA	CYTOMETRIA PRZEPŁYWOWA	MINIMALNE STĘŻENIA HAMUJĄCE
METODA DOŁKOWO-DYFUZYJNA	DETEKCJA MARTWYCH I ŻYWYCH KOMÓREK BAKTERYJNYCH	
ANALIZA MECHANIZMU DZIAŁANIA	ANALIZA CYTOTOKSYCZNOŚCI	

Ocena właściwości antybakteryjnych nanocząstek srebra

Oporność bakterii stanowi poważny problem współczesnej medycyny oraz weterynarii. Stąd rozwój nowych formułacji o działaniu antybakteryjnym jest obecnie poważnym wyzwaniem. W leczeniu infekcji skóry oraz błon śluzowych coraz większym zainteresowaniem cieszą się produkty oparte na zastosowaniu kompleksów srebra [18,19]. Wśród wielu znanych metod syntezy nanocząstek srebra, obecnie popularność zyskują techniki oparte na wykorzystaniu produktów pochodzenia naturalnego takich jak materiał roślinny, grzyby, bakterie oraz wirusy. Biologiczne metody syntezy są często znacznie tańsze i bardziej powtarzalne niż powszechnie do tej pory stosowane metody chemicznej syntezy. Tworzone podczas procesów biologicznych nanocząstki są też jednocześnie stabilizowane za pomocą związków naturalnych co wiąże się z ich niższą toksycznością w porównaniu do nanocząstek otrzymywanych drogą syntezy chemicznej [13,20,21].

Podczas badań wykorzystywano nanocząstki srebra otrzymywane w ramach realizacji projektu Symfonia. Do ich syntezy stosowano nowo identyfikowane szczepy promieniowców izolowane z kwaśnych gleb leśnych [22,23]. Promieniowce to mikroorganizmy należące do grupy gram dodatnich bakterii, które są powszechnie znanym źródłem związków aktywnych o działaniu antybakteryjnym oraz przeciwgrzybiczym. Nanocząstki otrzymane z pomocą metabolitów wydzielanych przez izolowane promieniowce wykazywały znaczące działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec szerokiego spektrum bakterii. W badaniach stosowano nanocząstki syntetyzowane przez szczepy CGG 11n oraz

HGG 16n [23,24], a ich skuteczność antybakteryjną wstępnie potwierdzono w oparciu o zastosowanie metody dyfuzyjno-krażkowej. Jednak celem podjętych badań było dalsze wzmocnienie ich potencjału antybakteryjnego. Z założenia dwie substancje o działaniu antybakteryjnym powinny wykazywać synergizm. W publikacji **H1** [24] wykorzystano synergizm działania dwóch czynników antybakteryjnych: antybiotyku oraz nanocząstek srebra typu HGG 16n w celu doboru skutecznych terapii przeciw różnym szczepom bakterii.

Analiza właściwości antybakteryjnych nanocząstek srebra jest zdecydowanie bardziej problematyczna aniżeli analiza antybiotyków. Spowodowane jest to dużym rozmiarem nanocząstek, które podczas testów na płytkach z zestaloną pożywką mogą słabiej dyfundować poprzez pory żelu aniżeli związki niskocząteczkowe i w ten sposób uzyskany wynik może nie w pełni odzwierciedlać rzeczywistą skuteczność antybakteryjną testowanego materiału. W związku z tym dalsze analizy właściwości antybakteryjnych czystych nanocząstek oraz ich kombinacji z antybiotykami oparto na najnowocześniejszych technikach wykorzystywanych w mikrobiologii: cytometrii przepływowej oraz mikroskopii fluorescencyjnej. Cytometria przepływowa jest metodą analityczną umożliwiającą szybki pomiar rozproszonego światła lub sygnałów fluorescencji emitowanych przez komórki. Do analiz wykorzystano jodek propidyny, który przenika jedynie przez błony martwych komórek i wiąże się z DNA wykazując maksimum wzbudzenia i emisji przy długości fali odpowiednio 535 i 617 nm. Wyniki uzyskane za pomocą cytometrii przepływowej potwierdzono analizą mikroskopową stosując kombinację dwóch barwników fluorescencyjnych: oranżu akrydyny oraz bromku etydyny. Oranż akrydyny przenika przez błony martwych i żywych komórek, natomiast bromek etydyny przenika jedynie przez błony komórek, które straciły integralność [25]. Analiza żywotności komórek bakteryjnych potwierdziła, że syntetyzowane z pomocą *Actinomycetes* nanocząstki srebra HGG 16n są skuteczne wobec *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella infantis*, *Escherichia coli* oraz *Bacillus subtilis*. Nanocząstki te były skuteczne już w najniższym zastosowanym stężeniu tj. 12,5 µg/mL w przeciwieństwie do nanocząstek typu CGG 11n w przypadku których skuteczność malała wraz ze wzrastającym stężeniem [24,26]. Synergistyczne działanie nanocząstek srebra oraz antybiotyku było szczególnie dobrze widoczne w przypadku *K. pneumoniae* traktowanego kombinacją nanocząstek oraz gentamycyny. Mikroskopia fluorescencyjna pozwoliła stwierdzić, że po 24 godzinnej inkubacji z nanocząstkami liczba martwych i żywych komórek jest porównywalna. Gentamycyna również nie prowadziła do znaczącej degradacji komórek bakteryjnych, większość komórek wykazywała zieloną fluorescencję. Natomiast kombinacja nanocząstek srebra oraz gentamycyny charakteryzowała się znaczącym działaniem bakteriobójczym – większość komórek emitowała czerwoną fluorescencję, co świadczy o przerwaniu ciągłości błony [**H1**] [24].

Poprawa właściwości antybakteryjnych nanocząstek srebra poprzez funkcjonalizację tetracykliną

Stosunek powierzchni nanocząstek srebra do ich objętości pozwala na unieruchomienie wielu cząsteczek bioaktywnych ligandów. Taka funkcjonalizacja powinna prowadzić do poprawy aktywności przeciwbakteryjnej nanocząstek [13,27]. W badaniach do funkcjonalizacji nanocząstek srebra wybrano tetracyklinę, antybiotyk o szerokim spektrum działania, który posiada wiele grup funkcyjnych mogących oddziaływać z cząsteczkami związków organicznych obecnych na powierzchni nanocząstek srebra [**H2**] [28,29]. **Synteza nanocząstek srebra**

funkcjonalizowanych antybiotykami umożliwia ich potencjalne zastosowanie w medycynie do bezpośredniego stosowania w leczeniu infekcji skóry i błon śluzowych.

W badaniach korzystano z chemicznie syntetyzowanych nanocząstek srebra stabilizowanych za pomocą PVP oraz biologicznie syntetyzowanych nanocząstek typu CGG 11n. Analiza kinetyki wiązania antybiotyku wykazała, że nanocząstki syntetyzowane biologicznie stanowią lepszy materiał do funkcjonalizacji, gdyż absorbują znacznie więcej antybiotyku aniżeli nanocząstki stabilizowane za pomocą PVP. Proces wiązania tetracykliny do nanocząstek CGG 11n nie był liniowy i można było wyróżnić 3 etapy: początkowy etap szybkiej sorpcji, etap wolnej sorpcji oraz etap równowagi. Proces sorpcji antybiotyku do powierzchni chemicznie otrzymany nanocząstek był niestabilny. Po początkowym okresie sorpcji następowała desorpcja. Obserwowane zjawiska pozwoliły stwierdzić, że stosowanie chemicznie stabilizowanych nanocząstek nie pozwoliło na otrzymanie stabilnych kompleksów [H2] [28].

Tworzenie stałych kompleksów antybiotyków z biologicznie syntetyzowanymi nanocząstkami srebra zostało potwierdzone za pomocą licznych analiz fizykochemicznych. Funkcjonalizacja nanocząstek prowadziła do znacznego wzrostu wielkości promienia hydrodynamicznego z 83,36 nm do 151 nm [H2] [28]. W celu oszacowania stabilności otrzymanych kompleksów dokonano pomiarów potencjału zeta. Znajomość potencjału zeta pozwala przewidzieć stabilność koloidów, wartości wyższe i niższe od ± 20 mV wskazują na stabilność dyspersji. Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, że proces funkcjonalizacji tetracykliną jedynie nieznacznie podnosi wartość potencjału zeta z -19,6 do -19,2 mV. Otrzymane wyniki sugerują, że otrzymane nanocząstki w długim okresie czasu pozostają stabilne [H2] [28].

Dla potwierdzenia procesu funkcjonalizacji wykonano również analizę spektroskopową, która pozwoliła wykryć zmiany wskazujące na sorpcję antybiotyku. Widma FTIR nanocząstek funkcjonalizowanych tetracykliną oraz niefunkcjonalizowanych znacząco się różnią. Szczególnie sygnał $\tilde{\nu} = 1577,8 \text{ cm}^{-1}$, który nie był obecny w widmie nanocząstek niepoddawanych funkcjonalizacji tetracykliną może pochodzić z wiązania rozciągającego C-C w aromatycznym pierścieniu tetracykliny. Natomiast nowe pasmo $\tilde{\nu} = 1134 \text{ cm}^{-1}$ prawdopodobnie pochodzi z wiązania C-N alifatycznej aminy obecnej w cząsteczce tetracykliny. Skuteczność wiązania tetracykliny do powierzchni antybiotyku potwierdzono za pomocą analizy całkowitej zawartości węgla organicznego (TOC). Wykazano, że podczas funkcjonalizacji zawartość węgla wzrasta z 0,715 mg/g srebra do 0,82 mg/g srebra [H2] [28].

Analizę właściwości antybakteryjnych funkcjonalizowanych nanocząstek srebra przeprowadzono dwiema metodami: dyfuzyjno-studzienkową oraz poprzez oznaczanie minimalnego stężenia hamującego (MIC, minimal inhibitory concentration). Nanocząstki srebra przed jak i po funkcjonalizacji charakteryzowały się wysoką skutecznością przeciw patogenom takim jak *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Staphylococcus aureus*. Dla większości testowanych szczepów bakterii nanocząstki funkcjonalizowane tetracykliną były skuteczniejsza aniżeli ich niefunkcjonalizowane odpowiedniki. Wyjątek stanowił szczep *E. coli* dla którego wartości MIC uzyskane dla nanocząstek funkcjonalizowanych tetracykliną oraz niefunkcjonalizowanych były takie same [H2] [28].

Badanie mechanizmu działania różnych form srebra na komórki bakteryjne

Do tej pory mechanizm działania nanocząstek srebra na komórki bakteryjne nie został do końca wyjaśniony i jest tematem wielu dyskusji. Dobrym modelem do badań tego zagadnienia są szczepy wykazujące pewien stopień oporności na stosowane nanocząstki. W ostatnich latach wskazuje się pojedyncze przypadki oporności niektórych szczepów *Bacillus subtilis* [30,31]. Aby poznać mechanizm działania nanocząstek srebra oraz ich funkcjonalizowanego odpowiednika wykorzystano komercyjnie dostępny szczep *Bacillus subtilis* PCM 2021, który jak wykazano podczas badań również charakteryzuje się wysokim poziomem oporności na nanocząstki srebra typu CGG 11n. Wartość minimalnego stężenia hamującego (*ang.* Minimal Inhibitory Concentration, MIC) dla czystych nanocząstek srebra wyniosła powyżej 200 µg/mL, natomiast dla nanocząstek funkcjonalizowanych tetracykliną 50 µg/mL. Przeprowadzone analizy jednoznacznie wykazały, że nanocząstki srebra w stężeniu 12,5 µg/mL, które było skuteczne wobec szczepów *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* czy *Proteus mirabilis* nie wpływają znacząco na rozwój *B. subtilis*. Nawet stężenie 100 µg/mL zahamowało wzrost *B. subtilis* jedynie o 13% w porównaniu z kontrolą nietraktowaną nanocząstkami [H3] [32]. Podobne zjawisko obserwowano dla spor *Bacillus* izolowanych z powietrza, które rozwinęły oporność na nanocząstki tlenku tytanu pokryte tlenkiem srebra [33] oraz szczepu Cu1065, który wykazywał oporność na nanocząstki srebra chemicznie syntetyzowane i stabilizowane za pomocą PVP [31]. Pomiary wzrostu jednoznacznie wykazały, że komórki *B. subtilis* wykazują wysoką wrażliwość na tetracyklinę oraz połączenie tetracykliny z nanocząstkami. Natomiast te same nanocząstki funkcjonalizowane tetracykliną nie wykazywały już takiej skuteczności, nie hamowały całkowicie wzrostu i po 7 godzinach inkubacji gęstość kultury była jedynie o 60% niższa od kontroli [H3] [32].

Kolejnym etapem wyjaśniania mechanizmu działania nanocząstek srebra na komórki bakteryjne była analiza ultrastruktury komórek *B. subtilis* traktowanych różnymi formami srebra: czystymi nanocząstkami, kombinacją nanocząstek srebra z tetracykliną, nanocząstkami funkcjonalizowanymi tetracykliną oraz jonami srebra. Po dwóch godzinach inkubacji z nanocząstkami srebra obserwowano rozpoczęcie procesu sporulacji. Endospory są formami przetrwalnikowymi i wykazują wysoki stopień oporności przeciw różnym czynnikom fizycznym oraz chemicznym takim jak: wysoka temperatura, promieniowanie UV i gamma, odwodnienie, uszkodzenie za pomocą odczynników chemicznych [34,35]. Po zastosowaniu kombinacji nanocząstek srebra z tetracykliną również obserwowano rozpoczęcie procesu sporulacji, jednak ze względu na obecność antybiotyku został on prawdopodobnie przerwany [H3] [32]. Powszechnie wiadomo, że rozwój endospor zależy od ekspresji oraz stopnia fosforylacji czynnika i regulatora transkrypcji Spo0A~P, który jest odpowiedzialny za aktywację kolejnych genów [34]. Niewykluczone, że tetracyklina poprzez hamowanie syntezy białek zatrzymuje proces sporulacji. Co ciekawe, nanocząstki srebra funkcjonalizowane tetracykliną nie inicjowały sprocesu sporulacji. **Uzyskany wynik sugeruje, że do inicjacji sporulacji potrzebny jest bezpośredni fizyczny kontakt nanocząstek srebra z powierzchnią komórki bakteryjnej.** W przypadku nanocząstek funkcjonalizowanych antybiotykiem, warstwa zaadsorbowanej tetracykliny jest na tyle duża, że prawdopodobnie uniemożliwia bezpośrednie oddziaływanie nanocząstek srebra z ścianą komórkową. Jak już wcześniej wspomniano analiza promienia hydrodynamicznego badanych nanocząstek wskazuje, że podczas funkcjonalizacji rośnie on z 86,36 nm aż do 151 nm [H2] [28].

Analiza poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) w odpowiedzi na obecność różnych form srebra oraz antybiotyku również przybliżyła mechanizm działania nanocząstek srebra. Wykazano, że poziom ROS w komórkach *Bacillus subtilis* po inkubacji z czystymi nanocząstkami srebra jest niższy aniżeli w komórkach kontrolnych [H3] [32]. Co po części wynika z faktu, że biologicznie syntetyzowane nanocząstki mogą odgrywać rolę akceptorów rodników. Ich wysoki potencjał antyoksydacyjny jest wynikiem adsorpcji na powierzchni nanocząstek związków produkowanych i wydzielanych przez mikroorganizmy [36,37]. Dlatego też wzrost w poziomie ROS w komórkach *B. subtilis* w odpowiedzi na obecność nanocząstek srebra może być kompensowany przez ich zdolność do natychmiastowego wiązania wolnych rodników [H3] [32]. Podobne zjawisko obserwowano w przypadku *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* traktowanych nanocząstkami srebra, kiedy to dodatek silnego antyoksydanta zdecydowanie obniżał poziom ROS indukowanych przez działanie AgNPs [38]. Najwyższy poziom ROS obserwowano dla nanocząstek srebra funkcjonalizowanych tetracykliną, był on wyższy niż dla samej tetracykliny oraz kombinacji nanocząstek srebra z tetracykliną. Powierzchnia funkcjonalizowanych nanocząstek jest pokryta warstwą antybiotyku, w związku z tym ich zdolność do wylapywania wolnych rodników jest ograniczona. **Jednoczesna obecność nanocząstek srebra i antybiotyku wywołuje synergistyczny efekt. Mikrouszkodzenia ścian i błon komórkowych jednocześnie z uwalnianiem cząsteczek tetracykliny w tych miejscach może być przyczyną znaczącego stresu oksydacyjnego** [H3] [32].

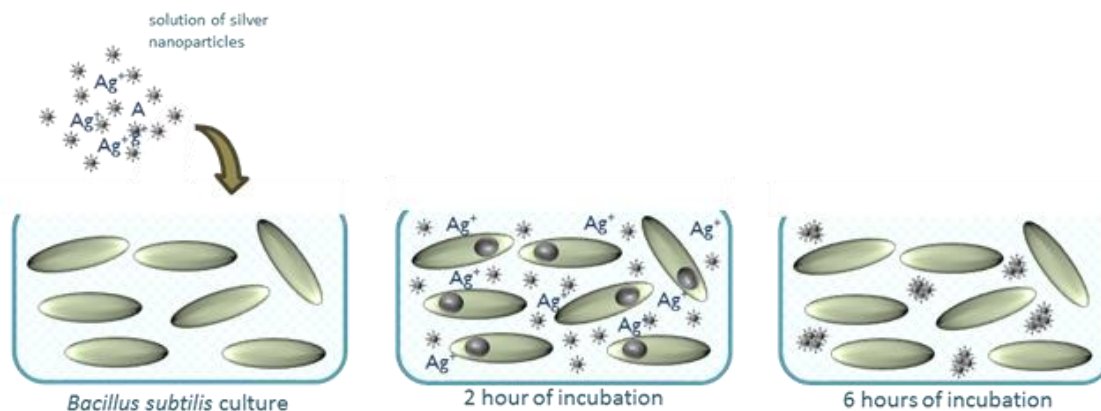
Wcześniejsze badania nad *B. subtilis* wykazały, że poziom ROS ma wpływ na inicjację procesu sporulacji. Wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego ROS prawdopodobnie prowadzi do zahamowania procesu sporulacji [39]. Uzyskane wyniki pozostają w zgodzie z tymi obserwacjami, ponieważ inkubacja komórek *B. subtilis* z czynnikami wywołującymi znaczący stres oksydacyjny nie indukowała procesu sporulacji. Natomiast inkubacja z nanocząstkami srebra nie przyczyniała się do powstawania stresu oksydacyjnego w komórkach *B. subtilis* i jednocześnie inicjowała proces sporulacji [H3] [32].

Przygotowania materiału do analizy za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej ujawniły, że podczas hodowli *B. subtilis* dochodzi do agregacji nanocząstek srebra. Obserwowane agregaty złożone są z wielu małych nanocząstek. Wiadomo, że stabilność koloidów zależy od wartości potencjału zeta, a jednym z czynników wpływających w zasadniczy sposób na jego wartość jest powierzchnia cząstek [40,41]. Uzasadnione wydaje się stwierdzenie, że podczas inkubacji na powierzchni nanocząstek dochodzi do adsorpcji związków wydzielanych przez komórki *B. subtilis* do środowiska wzrostu, co może przyczyniać się do zmiany potencjału zeta i utraty stabilności [H3] [32].

Jednym z postulowanych mechanizmów działania nanocząstek srebra na komórki jest uwalnianie jonów srebra, które mogą wiązać się z grupami tiolowymi oraz aminowymi białek, z kwasami nukleinowymi oraz błonami komórkowymi [13,42,43,44]. W wyniku tego oddziaływania dochodzi prawdopodobnie do uszkodzenia błon komórkowych oraz zaburzeń funkcjonowania enzymów i białek. Podczas analizy oddziaływania nanocząstek srebra z komórkami *B. subtilis* założono, że stosowany roztwór nanocząstek srebra może również zawierać jony srebra. Monitoring poziomu srebra w precypitatach powstałych po hodowli z *B. subtilis* wykazał, że podczas inkubacji dochodzi do strącania wolnych jonów srebra [H3] [32].

Przeprowadzone analizy pozwalają po raz pierwszy na postawienie hipotezy opisującej przebieg oddziaływania nanocząstek srebra z komórkami *B. subtilis*. W pierwszym etapie

bezpośredni fizyczny kontakt pomiędzy nanocząstkami, a powierzchnią komórek indukuje proces sporulacji. W tym czasie dochodzi do i) adsorpcji związków produkowanych przez *B. subtilis* na powierzchni nanocząstek w wyniku czego tracą one stabilność oraz ii) redukcji wolnych jonów srebra z udziałem związków wydzielanych przez badany szczep bakterii. W wyniku neutralizacji nanocząstek oraz jonów srebra, proces sporulacji zostaje zahamowany i komórki powracają do normalnych podziałów (Rys. 1).



Rys.1. Proponowany mechanizm oddziaływania nanocząstek srebra z komórkami *Bacillus subtilis* [H3] [32].

Oddziaływanie jonów srebra z komórkami bakteryjnymi jest wciąż bardzo słabo poznany procesem, choć ich właściwości antybakteryjne znane są od wieków [13,45,46]. Już niewielkie stężenia jonów srebra wykazują działanie antybakteryjne. W przypadku komórek *B. subtilis* całkowite zahamowanie wzrostu hodowli zachodziło przy stężeniu azotanu srebra 12,5 $\mu\text{g/mL}$, a stężenia 0,1 i 1 $\mu\text{g/mL}$ ograniczały wzrost o ponad 60% [H3] [32]. Natomiast izolowane z produktów mlecznych szczepy *Lactococcus lactis* i *Lactobacillus casei* wykazywały wyższy stopień oporności, po 24 godzinnej inkubacji z azotanem srebra o stężeniu 1, 0,1 oraz 0,01 $\mu\text{g/mL}$ gęstość hodowli nie odbiegała znacząco od kontroli. **Analiza za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej wykazała, że w wyniku oddziaływania z jonami srebra dochodzi do pogrubienia ścian komórkowych.** Zjawisko to obserwowano w przypadku *B. subtilis* jak i *L. casei* [H3, H4] [32,47]. **Takie zmiany w morfologii bakterii w odpowiedzi na obecność jonów srebra nie były do tej pory obserwowane i stanowią z pewnością jeden z mechanizmów obronnych polegający na zapobieganiu wnikania toksycznych jonów do delikatnego protoplasmu komórki** [H3] [47].

Opracowanie syntezy kompozytów srebra w oparciu o produkty pochodzenia mleczarskiego

Nanocząstki srebra syntetyzowane za pomocą promieniowców, choć wykazują wysoką skuteczność antybakteryjną, to ich pozyskiwanie nie jest łatwe, szczególnie ze względu na trudności w hodowli promieniowców na dużą skalę. W związku z tym kolejnym realizowanym celem było opracowanie metody pozyskiwania nanocząstek srebra w oparciu o metody mogące znaleźć praktyczne zastosowanie. Mleko i jego przetwory są bogatym i niedrogim źródłem materii organicznej o właściwościach prozdrowotnych, która może zostać wykorzystana do syntezy nanocząstek srebra. Uwagę skierowano na białko mleka zwane laktoferyną oraz bakterie kwasu mlekowego.

Laktoferyna (LTF) to białko mleka, które może być pozyskiwane z serwatki, produktu odpadowego przetwórstwa mlecznego. Jest to glikoproteina o masie ok. 80 kDa wykazująca duże powinowactwo do żelaza. Jej obecność potwierdzono również w wielu płynach ustrojowych oraz wydzielinach innych niż mleko np. w ślinie czy łzach. Białko to bierze udział w tworzeniu odporności swoistej (wrodzonej) jako pierwsza linia obrony przed drobnoustrojami. Mechanizm działania antybakteryjnego laktoferyny jest wciąż tematem wielu badań. Pierwsza z hipotez wskazywała na zdolność nienasyconego LTF do wiązania żelaza i tym samym wywołania efektów bakteriostatycznych u bakterii wymagających żelaza do wzrostu i rozwoju [48,49]. W innych badaniach udowodniono możliwość oddziaływania LTF z lipopolisacharydem bakterii gram ujemnych oraz kwasem lipotejchojowym bakterii gram dodatnich. W komórkach *E. coli* LTF hamuje przyleganie i tworzenie biofilmu poprzez wiązanie do części lipidowej LPS, co powoduje wzrost przepuszczalności błony oraz blokowanie białek wirulencji zakotwiczonych w błonie komórkowej [50]. Opisana aktywność wynika z działania laktoferycyny, peptydu utworzonego przez cięcie LTF [51]. Właściwości antybakteryjne są także przypisywane aktywności proteazy serynowej płata N [52].

Pierwszym etapem podjętych badań było opracowanie metody oczyszczania laktoferyny z serwatki mleka krowiego oraz identyfikacja oczyszczonego białka. W celu izolacji LTF zastosowano chromatografię jonowymienną ze złożem SP Sepharose fast flow, który jest silnym kationowym wymiennicem. LTF wmywano za pomocą 20 mM buforu fosforanowego zawierającego rosnące stężenie NaCl (0,3-0,9 M NaCl). Uzyskane frakcje odsalano i zateżano z wykorzystaniem systemu filtracji Amicon Ultra-15 o punkcie odcięcia 30 kDa [H5] [53].

Analizę immobilizacji srebra za pomocą laktoferyny przeprowadzono poprzez monitoring stężenia wolnych jonów srebra w roztworze w czasie. Na podstawie wyników badań kinetyki ustalono, że wiązanie srebra do LTF jest heterogenicznym procesem obejmującym dwa główne etapy: sorpcję do zewnętrznej powierzchni cząstek laktoferyny oraz wewnętrzną dyfuzję. Analiza za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej ujawniła, że w próbkach kompleksów laktoferyny ze srebrem obecne jest metaliczne srebro. Nanokompleksy srebra miały kulisty kształt i zazwyczaj występowały w diadach [H5] [53]. Analiza EDX potwierdziła, że srebro jest głównym pierwiastkiem obserwowanych nanokompleksów. Dzięki współpracy z grupą naukową z Korei udało się przybliżyć mechanizm wiązania jonów srebra do laktoferyny. Kwantowo-mechaniczne symulacje pozwoliły ustalić, że tworzenie nanocząstek było spontanicznie inicjowane w pierwszym etapie sorpcji podczas szybkiego wiązania jonów srebra do kwasu glutaminowego oraz asparaginowego na powierzchni laktoferyny. W drugim etapie, jony srebra dyfundują do wnętrza klastrów LTF i wiążą się do aktywnych grup LTF [H5] [53].

Aktywność przeciwdrobnoustrojową zsyntetyzowanych kompleksów laktoferyny przeciwko wybranym bakteriom klinicznym takim jak *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *MRSA* oraz *Staphylococcus aureus* potwierdzono za pomocą pomiarów gęstości optycznej hodowli, metody krążkowo-dyfuzyjnej oraz cytometrii przepływowej [H5] [53]. Gęstość optyczna pozwala na oszacowanie ilości komórek bakteryjnych w roztworze. Badania wykazały, że gęstość optyczna po inkubacji z kompleksami Ag-LTF jest niższa aniżeli w próbkach kontrolnych co wskazuje na fakt, że ograniczają one wzrost bakterii. Pomiarzy stref zahamowania wzrostu również potwierdziły właściwości antybakteryjne kompleksów Ag-LTF. Dla *MRSA*, *S. aureus* oraz *E. faecalis* otrzymano następujące średnice stref zahamowaniu wzrostu: 35, 25 oraz 28 mm.

Niemodyfikowane białko LTF nie wpływało na gęstość optyczną hodowli, nie obserwowano również stref zahamowania wzrostu wokół dysków nasączonych LTF, co wskazuje, że w zastosowanych stężeniach nie wykazuje ono znaczących właściwości przeciwbakteryjnych. Cytometria przepływowa pozwoliła również ocenić właściwości antybakteryjne czystego białka oraz jego kompleksów z Ag w stężeniu 12,5, 25 oraz 50 µg/mL. Badania wykazały, że LTF w stosowanych stężeniach nie wykazuje właściwości antybakteryjnych. W przypadku MRSA oraz *S. aureus* liczba żywych komórek była nawet wyższa aniżeli w próbkach kontrolnych bez dodatku białka. Jedynie *P. aeruginosa* był wrażliwy na LTF w stężeniu 50 µg/mL. Pomimo, że LTF jest powszechnie uznawane za białko o właściwościach antybakteryjnych, przeprowadzone analizy wskazują na jego ograniczone przeciwdrobnoustrojowe działanie. W niektórych przypadkach czynnik ten wręcz poprawiał żywotność bakterii. Przyczyną mogą być niskie stężenia białka lub różnice strukturalne wynikające z polimorfizmu nukleotydowego lub stopnia i rodzaju glikozylacji [54]. Natomiast kompleks Ag-LTF wykazywał skuteczne działanie antybakteryjne. *P. aeruginosa*, *S. aureus* oraz MRSA charakteryzowały się szczególną wrażliwością na działanie Ag-LTF. W stężeniu 12,5 µg/mL hamował wzrost *P. aeruginosa*, *S. aureus* i MRSA o odpowiednio 86,3%, 66% i 74,3%. Natomiast stężenie 50 µg/mL ograniczało wzrost *S. aureus* o 97%. W tej próbce obserwowano szczególnie dużą ilość martwych komórek (88,52%). Podobne wyniki otrzymano dla MRSA, gdzie wspomniane stężenie hamowało wzrost o 99,5%, a liczba martwych komórek sięgała 70,55%. Wysoki udział martwych komórek obecny był również w przypadku *E. faecalis* nawet w niższych stężeniach kompleksów Ag-LTF (81,14%). Uzyskane wyniki wskazują, że uzyskane kompleksy działają bakteriobójczo, a nie jedynie bakteriostatycznie. Najłabsze działanie antybakteryjne wykazywały wobec gram ujemnej *E. coli*, gdzie stężenie 12,5 µg/mL nie redukowało znacząco żywotności tych komórek bakteryjnych. Jedynie wyższe stężenia 25 oraz 50 µg/mL hamowały wzrost o ok. 67% [H5] [53].

Dla potwierdzenia właściwości antybakteryjnych otrzymanych kompleksów, porównano ich skuteczność ze skutecznością antybiotyków oraz biologicznie syntetyzowanych nanocząstek srebra. Dla *P. aeruginosa*, bakterii wykazującej naturalnie wysoki poziom oporności na różne antybiotyki Ag-LTF był równie skuteczny jak cefotaksym. Dla MRSA skuteczność tych kompleksów była porównywalna z klindamycyną oraz metronidazolem, a dla *E. coli* z amoksycyliną i kwasem klawulonowym. Natomiast porównując z nanocząstkami srebra, kompleksy Ag-LTF były skuteczniejsze jedynie wobec *P. aeruginosa* [H5] [53].

W ramach realizacji projektu Symfonia podjęto również zadanie opracowania bezpiecznej, szybkiej oraz niedrogiej metody otrzymywania nanocząstek srebra. Podczas opracowywania tej procedury brano pod uwagę możliwość jej wdrożenia w przemyśle farmaceutycznym oraz kosmetycznym. Już wcześniejsze badania wskazywały, że biomasa bakterii kwasu mlekowego jest dobrym czynnikiem redukującym [55,56]. Bakterie kwasu mlekowego (*ang.* Lactic Acid Bacteria, LAB) to grupa bakterii zdolna do fermentacji węglowodanów z wytworzeniem kwasu mlekowego. Źródłem tych mikroorganizmów jest mleko i produkty jego pochodzenia oraz kiszonki. Wykazują one właściwości prozdrowotne przede wszystkim poprzez hamowanie wzrostu bakterii patogennych. Większość z nich bytuje w układzie pokarmowym człowieka, gdzie stanowią barierę uniemożliwiającą rozwój szkodliwych mikroorganizmów jak również stymulują wrodzoną oraz nabytą odpowiedź immunologiczną. Bakterie kwasu mlekowego zdolne są również do syntezy bakteriocyn, małych białek o właściwościach antybakteryjnych [57,58]. Z tego względu

zastosowanie właśnie tych mikroorganizmów do syntezy nanocząstek wydaje się jednym z najbezpieczniejszych rozwiązań biorąc pod uwagę toksyczne związki stosowane do redukcji jonów srebra oraz stabilizacji nanocząstek w przypadku metody chemicznej syntezy lub szczepy o słabo poznanych właściwościach w przypadku biologicznej syntezy nanocząstek.

Pierwszym etapem opracowania procedury syntezy nanocząstek srebra było pozyskanie nowego szczepy bakterii z próbek mleka. Pozyskane szczepy bakterii identyfikowano za pomocą dwóch metod: sekwencjonowania 16S rDNA oraz intact cell MALDI TOF-MS. Pierwsza z wymienionych technik jest rutynowo stosowana w identyfikacji LAB [59,60]. W ostatnich latach coraz częściej stosowana jest metoda MALDI-TOF MS głównie ze względu na jej szybkość, powtarzalność oraz precyzję. Do dalszego opracowania protokołu wykorzystano nowo wyizolowany szczep *Lactococcus lactis* LCLB56 [KY484989], którego sekwencja 16S rDNA pokrywa się z *L. lactis* NCDO 604 [NR_040955]. Widmo MALDI-TOF MS wyizolowanego szczepu porównywano z widmem kontrolnego szczepu *L. lactis* ATCC 49032 i wykazano 99-100% podobieństwa. Pozyskany szczep zdeponowano w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów PCM pod numerem B/00116 [H6] [61].

W opracowywaniu protokołu wykorzystano nie biomasę bakterii, a jedynie płyn pochodzący. Takie rozwiązanie posiada wiele zalet, m.in. eliminuje konieczność oddzielania bakterii od powstałych nanocząstek oraz umożliwia wykorzystanie płynów pochodzących powstałych w przemyśle farmaceutycznym do produkcji probiotyków. Synteza nanocząstek srebra zachodzi z wykorzystaniem metabolitów wydzielanych przez komórki *L. lactis* do płynu hodowlanego. Skuteczność syntezy nanocząstek srebra potwierdzono za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej oraz analizy X-ray. Otrzymane nanocząstki były kulistego kształtu o rozmiarach od 5 do 50 nm (średnio 19 ± 2 nm). Widmo EDX również potwierdziło obecność nanocząstek srebra, obecne były charakterystyczne sygnały w zakresie 2,7-3,2 keV. Co więcej za pomocą analiz FTIR oraz MALDI-TOF MS potwierdzono występowanie organicznego depozytu odpowiedzialnego za stabilność nanocząstek. Analiza spektroskopowa wykazała obecność grup funkcyjnych obecnych m.in. w aminokwasach takich jak arginina, kwas glutaminowy oraz asparaginowy. Obecne były również sygnały wskazujące na obecność kwasu mlekowego. Analiza MALDI-TOF MS potwierdziła obecność kwasu mlekowego oraz peptydów zbudowanych głównie z argininy, kwasu glutaminowego, asparaginowego oraz aminokwasów zawierających pierścień aromatyczny (tryptofanu oraz tyrozyny) [H6] [61].

Nanokompozyty srebra syntetyzowane przez *L. lactis* (LCLB56) charakteryzowały się wysoką skutecznością wobec szczepów gram ujemnych (*P. aeruginosa*, *P. mirabilis*) oraz gram dodatnich (*S. epidermidis*, MSSA oraz *S. aureus*). Analiza minimalnego stężenia hamującego ujawniła, że nanokompozyty syntetyzowane z udziałem *L. lactis* wykazują lepsze właściwości antybakteryjne aniżeli nanocząstki srebra produkowane przez *Actinomyces* HGG 16n [H6] [61]. Szczególnie niskie wartości MIC uzyskano dla *S. aureus* i *P. mirabilis* ($3,12 \mu\text{g/mL}$) oraz *P. aeruginosa* ($6,25 \mu\text{g/mL}$). Dla MSSA wartość MIC była najwyższa i wynosiła $12,5 \mu\text{g/mL}$. Słabsze efekt antybakteryjny dla *S. aureus* osiągnęto dla wyższych stężeń nanokompozytów LCLB56, co potwierdziła również analiza martwych i żywych komórek za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. Zjawisko to prawdopodobnie wynika z agregacji nanocząstek srebra w wyższym stężeniu i było obserwowano również dla nanocząstek syntetyzowanych z wykorzystaniem promieniowców [26].

Wiele badań w ostatnich latach wskazuje na niekorzystne działanie nanocząstek srebra na komórki eukariotyczne. Mogą one inicjować zmiany na poziomie komórkowym, subkomórkowym oraz molekularnym. Dlatego też przed zastosowaniem otrzymanych nanokompozytów jako czynnika antybakteryjnego w przemyśle kosmetycznym lub farmaceutycznym konieczne jest potwierdzenie bezpieczeństwa ich stosowania. Pierwszym etapem w takim podejściu jest sprawdzenie cytotoksyczności wobec mysiej linii fibroblastów L929. Badania oparte na wykorzystaniu kultur komórkowych stanowią zwykle wstępną ocenę biokompatybilności, ponieważ są stosunkowo łatwe do wykonania, odtwarzalne i nie wymagają dużych nakładów środków. Co więcej, warunki podczas przeprowadzanych testów mogą być w pełni kontrolowane [62]. Aby wykluczyć możliwość wystąpienia niepożądanych działań uzyskanych nanokompozytów, przeprowadzono test cytotoksyczności na mysich fibroblastach linii L929, która jest zatwierdzona przez normę ISO (EN ISO 10993-5). Mysie fibroblasty linii L929 stanowią normalną linię komórkową, która jest wrażliwsza aniżeli komórki pierwotne [63]. Ta ciągła linia komórkowa jest rutynowo stosowana do testowania właściwości cytotoksycznych wyrobów medycznych. Do analizy żywotności komórek wykorzystano test MTT, który polega na analizie komórkowej aktywności metabolicznej za pomocą soli tetrazolowej (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy) (MTT). W komórkach aktywnych metabolicznie jest ona przekształcana w nierozpuszczalny fioletowy formazan, którego poziom jest oznaczany spektrofotometrycznie i porównywany z poziomem w komórkach kontrolnych [62]. Mechanizm redukcji MTT nie został w pełni wyjaśniony, ale prawdopodobnie wymaga reakcji z NADH lub innym związkami redukującymi, który przenosi elektrony do MTT.

Analiza cytotoksyczności nanokompozytów LCLB56 ujawniła, że 24 godzinna inkubacja nie powodowała spadku żywotności komórek L929. Dopiero po 48 godzinnej inkubacji żywotność komórek spadała, dla stężenia 25 µg/mL o niecałe 10%. Najwyższe testowane stężenie tj. 200 µg/mL obniżało żywotność o 33%. Nanocząstki srebra syntetyzowane z udziałem promieniowców CGG 11n charakteryzowały się wyższą toksycznością. Stężenie 200 µg/mL obniżało żywotność komórek o prawie 60% [H6] [61]. Uzyskane wyniki wskazują, że nanokompozyty syntetyzowane z udziałem szczepu LCLB56 potencjalnie stanowią bezpieczny środek antybakteryjny o dużym praktycznym zastosowaniu. Opracowana procedura została zgłoszona do ochrony patentowej [64].

Dobór warunków przygotowania oraz ekstrakcji materiału roślinnego w celu uzyskania produktu o właściwościach antybakteryjnych

Rośliny stanowią bogate źródło związków zwanych metabolitami wtórnymi. Nie są one niezbędne do ich wzrostu oraz rozwoju, ale odpowiadają za adaptację do zmieniających się warunków środowiska, m.in. chronią roślinę przed atakiem patogennych bakterii, wirusów oraz grzybów. Związki te mogą wykazywać działanie antybakteryjne również wobec patogenów ludzkich. Do metabolitów wtórnych zaliczane są związki z grupy polifenoli, flawonoidów, saponin, terpeny, lignany, glukozytolany. W zależności od swojej struktury wykazują różne właściwości biologiczne od antyoksydacyjnych, antybakteryjnych, przeciugrzybiczych po modelujące aktywność enzymatyczną. Biorąc pod uwagę powyższe rośliny stanowią doskonałe źródło nowych związków o charakterze przeciwdrobnoustrojowym [65,66]. Kluczowym etapem w pozyskiwaniu tych metabolitów jest dobór odpowiednich warunków ekstrakcji [16,17].

Istnieje wiele technik izolowania biologicznie aktywnych związków z roślin. Różnią się znacząco w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika, temperatury i ciśnienia. Różnice w strukturze wyizolowanych metabolitów decydują o ich rozpuszczalności w rozpuszczalnikach o różnej polarności. Dlatego też typ rozpuszczalnika ekstrakcyjnego, jak również technika izolacji (ekstrakcja) mają znaczący wpływ na wydajność ekstrakcji wtórnych metabolitów roślinnych i jednocześnie na aktywność otrzymanych ekstraktów [16,67]. Maceracja jest powszechnie stosowana do pozyskiwania różnych biologicznie aktywnych związków występujących w roślinach. Jednak podobnie jak inne konwencjonalne metody, ma wiele wad, np. często wiąże się z zastosowaniem dużych ilości toksycznych rozpuszczalników i niską selektywnością [68]. Dlatego obecnie szczególną uwagę skupia się na rozwoju procesów chemicznych, które polegają na stosowaniu przyjaznych dla środowiska rozpuszczalników. Toksyczne rozpuszczalniki jak metanol, aceton czy heksan zastępowane są etanolem czy ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym. Szczególnie zastosowanie ekstrakcji płynem w stanie nadkrytycznym (SFE) zyskuje dużą popularność jako alternatywa dla konwencjonalnych technik, ponieważ wpisuje się w założenia tzw. „zielonej chemii”. Najbardziej pożądanym rozpuszczalnikiem stosowanym w SFE jest ditlenek węgla. Posiada on wiele zalet: jest nietoksyczny i niepalny. Ponadto, osiąga stan nadkrytyczny przy niskich wartościach temperatury 31.1°C oraz ciśnienia 7.39 MPa. Otrzymane za pomocą scCO₂ ekstrakty nie są zanieczyszczone rozpuszczalnikami. Ekstrakcja z tym rozpuszczalnikiem gwarantuje lepszą selektywność i krótsze czasy ekstrakcji w porównaniu z konwencjonalnymi technikami [5].

Nadrzędnym celem badań było opracowanie nowych formułacji o właściwościach antybakteryjnych z wykorzystaniem surowców naturalnych. Do realizacji powyższego celu wybrano gatunki roślin, których biomasa łatwo uzyskać *Lepidium sativum*, *Lupinus luteus* oraz *Solidago gigantea* [H7, H8, H9] [69,70,71]. W pierwszym etapie badań nad pozyskiwaniem ekstraktów o właściwościach biologicznych porównywano skuteczność izolacji związków bioaktywnych z wykorzystaniem rozpuszczalników uznawanych za przyjazne dla środowiska, tj. etanolu o różnym stężeniu, wody oraz dwutlenku węgla w stanie nadkrytycznym. Suszone i liofilizowane kielki rzeżuchy (*L. sativum*) poddawano procesowi maceracji, ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami (UAE), ekstrakcji wspomaganą temperaturą i ciśnieniem (ASE) oraz ekstrakcji płynem w stanie nadkrytycznym (SFE). W otrzymanych ekstraktach porównywano zawartość związków polifenolowych, flawonoidów, izotiocyjanianów, aktywność antyoksydacyjną oraz właściwości antybakteryjne [H7] [69].

Kompozycja ekstraktów w głównej mierze zależała od rodzaju zastosowanego rozpuszczalnika. Woda była szczególnie skuteczna w ekstrakcji związków polifenolowych z nasion *L. sativum*. Dla każdej z analizowanych technik ekstrakcji 70% etanol był skuteczniejszy w pozyskiwaniu związków fenolowych w porównaniu z 96% etanolem. Z kolei 96% etanol był lepszym rozpuszczalnikiem dla flawonoidów. Najwyższą zawartość flawonoidów zanotowano dla ekstraktu SFE z dodatkiem 96% etanolu jako współrozpuszczalnika. Ta technika ekstrakcji była skuteczna również w izolacji izotiocyjanianów z suszonych kielków rzeżuchy.

W badaniach wykorzystano dwa typy materiału: suszony oraz liofilizowany. W celu porównania struktury obu materiałów wykonano analizę za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). Materiał poddawany suszeniu pokryty był bardzo drobnymi fragmentami tkanek, z kolei materiał poddawany liofilizacji był ich praktycznie pozbawiony. Cząstki liofilizowanego materiału były gładkie. Obserwacje te wskazują na ułatwiony transfer masy w przypadku suszonych siewek rzeżuchy w wyniku ich większego stopnia uszkodzenia. Stąd pomimo faktu, iż liofilizowany materiał z pewnością zawiera więcej związków biologicznie aktywnych, to ich odzysk jest łatwiejszy z suszonego materiału.

Najwyższą skuteczność antybakteryjną wykazały ekstrakty pozyskane za pomocą ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym z dodatkiem 96% etanolu jako współrozpuszczalnika, które były szczególnie bogate w flawonoidy. Ekstrakt pozyskiwany tą techniką z liofilizowanych siewek dawał największe strefy przejaśnienia dla *S. aureus*, *P. mirabilis*, *S. epidermidis* i *P. aeruginosa*, natomiast ekstrakt siewek suszonych wykazywał skuteczność wobec *S. aureus*, *P. mirabilis* i *S. epidermidis*. Do dalszych analiz wybrano ekstrakt SFE z liofilizowanego materiału. Najniższą wartość MIC 0,5 mg/mL dla tego ekstraktu uzyskano dla *P. mirabilis* oraz *P. aeruginosa*. Dla *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *S. infantis* i *E. coli* wartość MIC wynosiła 1mg/mL.

Solidago gigantea (nawłóć olbrzymia) jest gatunkiem szeroko rozpowszechnionym w Polsce, który został zawleczony prawdopodobnie z Ameryki Północnej. Jest gatunkiem inwazyjnym, z łatwością się rozmnaża i wypiera rodzime gatunki roślin. Stąd uzasadnione jest poszukiwanie praktycznego zastosowania tego materiału roślinnego. Prowadzone do tej pory badania pokazują, że nawłóć bogata jest metabolity wtórne z grupy flawonoidów, monoterpenu, diterpenów, triterpenów jak i saponin oraz związki zawierające azot [70,72]. Celem podjętych badań było uzyskanie dużej ilości produktu o wysokiej aktywności biologicznej z wykorzystaniem technik przyjaznych środowisku. Cel ten osiągnięto poprzez optymalizację procesu ekstrakcji nawłóci olbrzymiej za pomocą CO₂ w stanie nadkrytycznym w skali ćwierćtechnicznej, a następnie przeniesienie optymalnych warunków na skalę półtechniczną. Optymalizację prowadzono względem następujących kryteriów: maksymalna wydajność, zawartość związków fenolowych (TPC), lipidów oraz chlorofilu [H8] [71]. W celu opracowania optymalnych warunków wykorzystano metodologię powierzchni odpowiedzi (RSM, Response Surface Methodology). Ten model statystyczny umożliwia monitorowanie wpływu jednocześnie kilku zmiennych na wielkość zależną i pozwala ocenić nie tylko liniowy wpływ wybranych zmiennych, ale również ich wzajemne interakcje. Równania proponowane podczas optymalizacji metodą RSM tak dopasowują powierzchnię odpowiedzi wyznaczoną podczas realizacji planu doświadczalnego, aby symulowała rzeczywistą zakrzywioną powierzchnię w stanie granicznym. Ekstrakcję prowadzono we współpracy z zespołem Instytutu Nowych Syntez w Puławach. Dzięki temu uzyskano możliwość stosowania warunków ekstrakcji, które nie są stosowane w skali laboratoryjnej. Maksymalne ciśnienie stosowane w instalacjach laboratoryjnych to ok. 35 MPa, w warunkach przemysłowych możliwe było przetestowanie skuteczności ciśnienia 80 MPa [H8] [71].

Analiza wyników ujawniła, że wzrost temperatury powoduje poprawę wydajności procesu. Odwrotny efekt obserwowano dla TPC, ilość składników fenolowych w ekstrakcie malała, gdy temperatura rosła. Wpływ temperatury na całkowitą zawartość lipidów nie był znaczący. Lipidy są związkami niepolarnymi, które łatwo rozpuszczają się w niepolarnym dwutlenku węgla nawet przy niskiej wartości parametrów procesu. Całkowita zawartość chlorofilu była tylko nieznacznie zależna od temperatury procesu. W oparciu o wykresy powierzchni odpowiedzi ustalono, że wzrost ciśnienia procesowego powoduje podniesienie wartości wszystkich odpowiedzi. Całkowita zawartość fenoli wzrastała znacząco wraz ze wzrostem ciśnienia. Powszechnie wiadomo, że niepolarne składniki roślinne dobrze rozpuszczają się w ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym, ze względu na jego niepolarny charakter. W związku z tym ich ekstrakcja nie wymaga wysokich wartości parametrów takich jak ciśnienie i temperatura. Do tej pory podejmowano próby ekstrakcji związków polarnych za pomocą ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym z zastosowaniem ciśnienia do 50 MPa [71]. W badaniach zaplanowanych na *S. gigantea* zastosowano maksymalne ciśnienie 80 MPa i udowodniono, że dalsze podnoszenie ciśnienia powyżej 50 MPa powoduje wzrost zawartości związków polifenolowych w otrzymanym ekstrakcie. Najmniejszy wpływ na otrzymane wartości

wyjściowe miał przepływ rozpuszczalnika. Całkowita zawartość lipidów spadała wraz ze wzrostem przepływu do pewnego momentu, a następnie rosła, ale nie osiągała początkowej wartości. Całkowita zawartość związków polifenolowych również spadała wraz ze wzrostem przepływu, co mogło być spowodowane zbyt szybką wymianą rozpuszczalnika. Jedynie dla wydajności ekstrakcji, wysoka wartość przepływu rozpuszczalnika była optymalna [H8] [71].

Otrzymane w warunkach ćwierćtechnicznych optymalne warunki ekstrakcji – temperatura 80°C, ciśnienie 72,31 MPa, przepływ 6,97 kg/h – przenoszono na skalę półtechniczną. Z ekonomicznego punktu widzenia, parametry ekstrakcji powinny być tak dobrane, aby uzyskać jak najwyższą wydajność procesu ekstrakcji. Proces przenoszenia skali przeprowadzono w Instytucie Nowych Syntez w Puławach wg następujących kryteriów: stały przepływ rozpuszczalnika do masy wsadu, stała masa rozpuszczalnika do masy wsadu lub stałe obydwie parametry. Najlepsze rezultaty uzyskano stosując oba stałe kryteria przenoszenia skali tj. stałą masę i przepływ rozpuszczalnika w stosunku do masy wsadu. Otrzymany w warunkach przemysłowych ekstrakt ma postać zielonej gęstej pasty całkowicie pozbawionej rozpuszczalnika. Może on znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym lub spożywczym. Jego właściwości biologiczne były analizowane w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky UMK w Toruniu. Zastosowanie procedury optymalizacji ekstrakcji oraz przenoszenia skali umożliwiło uzyskanie produktu o doskonałych właściwościach biologicznych [H8] [71].

Właściwości antybakteryjne ekstraktu z nawłoci olbrzymiej oceniano na podstawie wartości MIC. Najniższe wartości MIC (0,125 mg/mL) świadczące o najlepszym działaniu antybakteryjnym uzyskano dla gram ujemnych *P. aeruginosa* oraz *Acinetobacter baumannii* oraz gram dodatniej *B. subtilis*. Zarówno *A. baumannii* jak i *P. aeruginosa* są bakteriami oportunistycznymi, wywołującymi wiele zakażeń szpitalnych u osób z obniżoną odpornością. *P. aeruginosa* posiada naturalną oporność na wiele antybiotyków, co jest związane ze względną nieprzepuszczalnością jego ściany i błon komórkowych. Wyższe wartości MIC (0,25 mg/mL) zanotowano dla takich patogenów jak *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. aerogenes*, *E. coli* oraz *S. infantis* [H8] [71].

Ditlenek węgla w stanie nadkrytycznym stosowany jest przede wszystkim do ekstrakcji niepolarnych związków zawartych w materiale roślinnym. Aby poprawić skuteczność ekstrakcji związków biologicznych o bardziej polarnym charakterze stosuje się dodatek polarnego współrozpuszczalnika [74,75]. W prowadzonych badaniach proces ekstrakcji ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym z dodatkiem etanolu jako współrozpuszczalnika wykorzystano do pozyskania związków biologicznie aktywnych z łubinu żółtego (*Lupinus luteus*). Łubin żółty to roślina z rodziny bobowatych. Wiele badań wskazuje na wysoką zawartość związków fenolowych [76,77]. Z przemysłowego punktu widzenia wysoka zawartość związków fenolowych jest kluczowa dla funkcjonalności ekstraktów roślinnych. W związku z tym, podjęto próbę optymalizacji ekstrakcji łubinu żółtego za pomocą dwutlenku węgla w stanie nadkrytycznym z dodatkiem etanolu jako współrozpuszczalnika celem pozyskania produktu bogatego w polifenole. Optymalizację prowadzono z wykorzystaniem metodologii powierzchni odpowiedzi (RSM) z trzema zmiennymi parametrami: temperatura, ciśnienie oraz dodatek współrozpuszczalnika. W celu zwiększenia zawartości związków polifenolowych nasiona łubinu poddawano kiełkowaniu przez 6 dni. Uzyskane optymalne warunki do otrzymania ekstraktu bogatego w związki fenolowe to temperatura 73°C, ciśnienie 147 bar oraz udział współrozpuszczalnika 16.1%. Ekstrakt uzyskany w takich warunkach wykazał zdolność do hamowania wzrostu testowanych bakterii patogennych. Najbardziej wrażliwy na jego działanie okazał się *P. aeruginosa* z wartością MIC 60 µg/mL. Dla *A. baumannii* uzyskano

wartość 0,5 mg/mL. Niezwykle niska wartość MIC w przypadku *P. aeruginosa* ma wyjątkowe znaczenie ze względu na jej naturalną oporność na wiele antybiotyków. Dla potwierdzenia uzyskanych wyników wykonano barwienie komórek martwych oraz żywych za pomocą oranżu akrydyny oraz bromku etydyny. W badanych próbkach *P. aeruginosa* oraz *P. mirabilis* po zastosowaniu ekstraktu z łubinu obserwowano znaczący spadek liczby komórek. Po zaledwie 4 godzinach inkubacji pojedyncze komórki wykazywały czerwoną fluorescencję co wskazuje na bakteriobójcze działanie ekstraktu SFE z łubinu żółtego. Analiza HPLC-MS/MS ujawniła, że antybakteryjne właściwości otrzymanego ekstraktu korelują z wysoką zawartością apigeniny (68,326 ng/mg) i fisetyny (63,269 ng/mg) [H9] [70,78]. Działanie przeciwdrobnoustrojowe apigeniny znane jest od wielu lat, natomiast ostatnie badania wskazują również na znaczące działanie antybakteryjne fisetyny [79].

Technika i warunki ekstrakcji mają kluczowe znaczenie w pozyskiwaniu związków biologicznie aktywnych z materiału roślinnego, a ich optymalizacja prowadzi do znaczącej poprawy aktywności biologicznej uzyskanych produktów. Jednak wciąż podstawowym problemem jest niski poziom związków bioaktywnych w materiale roślinnym. Stąd obok optymalizacji procesów ekstrakcji rozwiązaniem jest podniesienie poziomu ich syntezy na etapie wzrostu roślin. W procesie tym wykorzystuje się elicytory, które są czynnikami stresowymi aktywującymi szlaki metabolizmu wtórnego. Elicytory od wielu lat są stosowane w roślinnych kulturach *in vitro* do poprawy wydajności syntezy związków o znaczeniu farmaceutycznym np. taksolu [80]. Elicytory można podzielić na te pochodzenia biologicznego tzw. elicytory biotyczne oraz elicytory abiotyczne. Do elicytorów biotycznych zaliczane są polisacharydy ścian komórkowych roślin, grzybów lub innych patogennych organizmów, a także fragmenty pektyn, celulozy oraz chityna. Elicytory abiotyczne to przede wszystkim czynniki fizyczne, takie jak uszkodzenia mechaniczne, promieniowanie UV, zasolenie, susza, ozon oraz chemiczne w tym związki nieorganiczne oraz sole metali ciężkich. Spośród elicytorów abiotycznych jony srebra są stosunkowo często stosowane w roślinnych kulturach *in vitro*, m.in. do podnoszenia poziomu syntezy związków fenolowych oraz tanszinonów w kulturze korzeni włośnikowych *Salvia miltiorrhiza* [81]. Ponadto w kulturze komórek *Agastache rugosa* wykazano, że azotan srebra prowadzi do wzrostu poziomu ekspresji genów ścieżki fenylopropanoidowe, tzn. biorących udział w syntezie metabolitów wtórnych [67].

W prowadzonych badaniach również wykorzystano azotan srebra jako czynnik pobudzający syntezę związków bioaktywnych w *L. sativum*. Jako materiał roślinny nie wykorzystano kultur *in vitro*, a kielki. Hodowla kielków roślinnych jest zdecydowanie opłacalniejszą metodą pozyskiwania materiału roślinnego na dużą skalę. Liofilizowane kielkujące rośliny poddawane działaniu jonów srebra o stężeniu 100 mg/L oraz hodowane w tych samych warunkach rośliny nie poddawane działaniu srebra stanowiły materiał do ekstrakcji wspomaganą temperaturą i ciśnieniem. Jako ekstrahent zastosowano 96% etanol. Analiza otrzymanych ekstraktów wykazała, że zawartość związków fenolowych w roślinach traktowanych jonami srebra jest ponad 3 krotnie wyższa aniżeli w roślinach kontrolnych. Zawartość flawonoidów była dwukrotnie wyższa. Wartości IC₅₀ potencjału antyoksydacyjnego mierzonego za pomocą DPPH wskazują na zdecydowanie lepsze właściwości antyoksydacyjne ekstraktów z roślin poddawanych elicytacji (4,78 mg/mL) w porównaniu z roślinami kontrolnymi (12,43 mg/mL). Opracowana procedura elicytacji została zgłoszona do ochrony patentowej [82].

Znaczące różnice dotyczyły właściwości antybakteryjnych obydwu ekstraktów. Ekstrakt pozyskany z roślin poddawanych działaniu jonów srebra wykazywał działanie antybakteryjne wobec *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* oraz *E. coli* na co wskazują pomiary stref zahamowania wzrostu oraz wartości minimalnego stężenia hamującego. W przypadku ekstraktu z roślin

kontrolnych nie odnotowano stref zahamowania wzrostu, a wartości MIC sięgały poziomu 2,5-5 mg/mL. Zakres MIC dla ekstraktu pozyskiwanego z roślin poddawanych elicytacji był o wiele niższy i wynosił od 0,6 do 1,25 mg/mL [82].

Hodowla roślin na podłożu zawierającym jony srebra związane jest z ich pobieraniem ze środowiska wzrostu. Analiza za pomocą atomowej spektroskopii absorpcyjnej (AAS) wykazała, że w liofilizacie rzeżuchy zawiera do 1,5 mg srebra na g suchej masy. Podczas ekstrakcji jony te przechodzą do roztworu jedynie w niewielkiej ilości ok. 6,25 µg/g suchej masy ekstraktu. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że to związki biologicznie aktywne pozyskiwane z *L. sativum* odpowiadają za właściwości antybakteryjne ekstraktu [82].

Analiza toksyczności otrzymanych formułacji roślinnych względem prawidłowych komórek

Wyciągi roślinne były stosowane od wieków w celu leczenia chorób. Jednak w zależności od kompozycji oraz dawki ich działanie może być toksyczne. Do tej pory znanych jest wiele roślin bądź czystych związków z nich izolowanych o działaniu rakotwórczym, neurotoksycznym, genotoksycznym, teratogennym, cytotoksycznym, nefrotoksycznym oraz hepatotoksycznym [71]. W związku z tym pożądane jest wykonanie testów stwierdzających bezpieczeństwo stosowania wielu produktów pochodzenia roślinnego. W celu analizy cytotoksyczności ekstraktów roślinnych wykonano test MTT na linii komórkowej L929. Metoda ta pozwoliła oszacować żywotność komórek po 48 godzinnej inkubacji. Ekstrakty SFE z *S. giagantea* oraz *L. luteus* nie prowadziły do spadku żywotności komórek w zakresie stężeń do 0,5 mg/mL [H8, H9] [70,71]. Ekstrakt SFE *L. sativum* w stężeniach 0,125-1 mg/mL również nie wpływał znacząco na żywotność komórek [H7] [69]. Uzyskane dane wskazują, że otrzymane formułacje roślinne w stężeniach wywołujących efekt antybakteryjny są potencjalnie bezpieczne w stosowaniu. Te właściwości otwierają drogę do wielu praktycznych zastosowań, w tym jako skuteczny czynnik antybakteryjny w leczeniu infekcji skórnych lub jako konserwant w przemyśle kosmetycznym, który zastąpi kontrowersyjne parabeny oraz fenoksytanol.

Elementy nowości, wkład do dyscypliny i podsumowanie osiągnięcia naukowego

Wyniki badań przedstawione w monotematycznym cyklu publikacji **H1-H9** pozwalają na następujące podsumowanie osiągnięcia naukowego:

- (1) Dokonano nowatorskiej oceny właściwości antybakteryjnych nanocząstek srebra biologicznie syntetyzowanych przez nowo izolowany szczep promieniowców z wykorzystaniem nowoczesnych technik biologii molekularnej: cytometrii przepływowej oraz barwień komórek bakteryjnych za pomocą znaczników fluorescencyjnych [H1].
- (2) Opracowano metody funkcjonalizacji nanocząstek srebra za pomocą antybiotyku. Po raz pierwszy analizowano kinetykę wiązania antybiotyku do powierzchni nanocząstek oraz dokonano fizykochemicznej analizy otrzymanego produktu [H2].
- (3) Po raz pierwszy wyjaśniono mechanizm działania jonów srebra, nanocząstek srebra oraz nanocząstek srebra funkcjonalizowanych antybiotykiem na wybrane szczepy bakterii [H3, H4].
- (4) Opracowano oryginalne metody syntezy nanokompleksów srebra w oparciu o wykorzystanie produktów pochodzenia mleczarskiego: bakterii kwasu mlekowego oraz laktoferyny izolowanej z serwatki [H5, H6].

- (5) Dobrano warunki przygotowania oraz ekstrakcji materiału roślinnego ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym w celu uzyskania produktu o właściwościach antybakteryjnych [H7, H8, H9]. W ekstrakcji płynem w stanie nadkrytycznym *Solidago gigantea* zastosowano zakres parametrów nie stosowany do tej pory w ekstrakcjach prowadzonych w warunkach laboratoryjnych (ciśnienie do 80 MPa), co pozwoliło uzyskać biologicznie aktywny produkt z wysoką wydajnością ok. 7% [H8].

Inne osiągnięcia niewchodzące w skład cyklu prac habilitacyjnych po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora opublikowałam 18 prac niewchodzących w skład cyklu prac habilitacyjnych, których łączny współczynnik wpływu IF wynosi 56,929.

W ramach realizacji projektu Symfonia podjęłam tematykę badawczą dotyczącą analizy fizykochemicznej oraz właściwości antybakteryjnych nanocząstek srebra syntetyzowanych przy użyciu promieniowców [22,23,26]. W ostatnich latach moja tematyka badawcza obejmowała problem ekstrakcji związków biologicznie aktywnych z materiału roślinnego za pomocą rozpuszczalników przyjaznych środowisku takich jak etanol oraz ditlenek węgla w stanie nadkrytycznym [83,84]. W ramach realizacji podjętych zadań współpracowałam z Instytutem Nowych syntez Chemicznych w Puławach w celu optymalizacji procedur ekstrakcji oraz przeniesienia skali ekstrakcji, a wyniki tej współpracy zostały wydane w postaci dwóch publikacji [5,6]. Jako metodę skutecznego przygotowania materiału roślinnego do ekstrakcji wprowadziłam ekstrakcję wspomaganą enzymatycznie, a zagadnienia związane z tą tematyką obecnie kontynuuję w ramach realizacji projektu Miniatura [7].

Perspektywy badawcze

W ramach realizacji projektu NCN Miniatura pt. “*Wpływ struktury oraz kompozycji materiału roślinnego na ekstrakcję wybranych związków biologicznie aktywnych*” (2018/02/X/ST4/01351) po raz pierwszy skuteczność hydrolizy enzymatycznej będzie weryfikowana bezpośrednio w materiale roślinnym za pomocą barwień histochemicznych oraz reakcji immunocytochemicznych dzięki którym zostaną zlokalizowane poszczególne składowe ścian komórkowych. Projekt, który realizuję ma charakter interdyscyplinarny, narzędzia biologii molekularnej (reakcje immunocytochemiczne) posłużą do wyjaśnienia zjawisk leżących u podstaw procesu ekstrakcji. Opisane podejście umożliwi ocenę stopnia hydrolizy ścian komórkowych na przekrojach cząstek materiału roślinnego poddawanych ekstrakcji oraz stopień wnikania enzymów do wnętrza cząstek materiału. Stopień enzymatycznej hydrolizy ścian komórkowych będzie korelowany ze skutecznością ekstrakcji wybranych związków biologicznie aktywnych. W tym celu zostaną wykorzystane konwencjonalne i niekonwencjonalne techniki ekstrakcji takie jak maceracja, przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem i ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym. Planuję również kontynuację badań nad mechanizmami oddziaływań nanocząstek srebra z komórkami bakteryjnymi z wykorzystaniem takich narzędzi jak transmisyjna mikroskopia elektronowa oraz MALDI-TOF-MS.

Szczegółowy wykaz całkowitego dorobku naukowego

Dane bibliometryczne:

Całkowita liczba publikacji ze współczynnikiem IF: 30

Łączna wartość punktów ministerialnych: 896

Łączna wartość wskaźnika IF: 100,032

Cytowania na podstawie Web of Science: 187

Cytowania (bez autocytowań) Web of Science: 155

Indeks H (wg bazy Web of Science): 10

Literatura

- [1] Zienkiewicz K, Zienkiewicz A, Smoliński DJ, **Rafińska K**, Świdziński M, Bednarska E. Transcriptional state and distribution of poly(A) RNA and RNA polymerase II in differentiating *Hyacinthus orientalis* L. pollen grains. *Sex Plant Reprod* 2008;21. doi:10.1007/s00497-008-0085-9.
- [2] **Rafińska K**, Bednarska E. Localisation pattern of homogalacturonan and arabinogalactan proteins in developing ovules of the gymnosperm plant *Larix decidua* Mill. *Sex Plant Reprod* 2011;24. doi:10.1007/s00497-010-0154-8.
- [3] **Rafińska K**, Zienkiewicz K, Bednarska E. Pollen transcriptome and proteome: Molecular and functional analysis. *Adv Cell Biol* 2010;2010. doi:10.2478/v10052-010-0003-9.
- [4] **Rafińska K**, Świdziński M, Bednarska-Kozakiewicz E. Homogalacturonan deesterification during pollen-ovule interaction in *Larix decidua* Mill.: An immunocytochemical study. *Planta* 2014;240. doi:10.1007/s00425-014-2074-6.
- [5] Wrona O, **Rafińska K**, Możeński C, Buszewski B. Supercritical Fluid extraction of bioactive compounds from plant materials. *J AOAC Int* 2017;100. doi:10.5740/jaoacint.17-0232.
- [6] **Rafińska K**, Pomastowski P, Wrona O, Górecki R, Buszewski B. *Medicago sativa* as a source of secondary metabolites for agriculture and pharmaceutical industry. *Phytochem Lett* 2017;20. doi:10.1016/j.phytol.2016.12.006.
- [7] Krakowska A, **Rafińska K**, Walczak J, Buszewski B. Enzyme-assisted optimized supercritical fluid extraction to improve *Medicago sativa* polyphenolics isolation. *Ind Crops Prod* 2018;124. doi:10.1016/j.indcrop.2018.08.004.
- [8] O'Neill J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. *Rev Antimicrob Resist* 2016. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005.
- [9] Silver S. Bacterial silver resistance: Molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol Rev* 2003. doi:10.1016/S0168-6445(03)00047-0.
- [10] Silver LL. Challenges of antibacterial discovery. *Clin Microbiol Rev* 2011. doi:10.1128/CMR.00030-10.
- [11] World Health Organization. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System. Manual for Early Implementation. 2015. doi:10.1016/j.meegid.2011.02.013.
- [12] WHO. GLASS | Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report. 2018. doi:10.1016/S1473-3099(18)30060-4.
- [13] Chernousova S, Epple M. Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal. *Angew Chemie - Int Ed* 2013. doi:10.1002/anie.201205923.
- [14] Siddiqi KS, Husen A, Rao RAK. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J Nanobiotechnology* 2018. doi:10.1186/s12951-018-0334-5.
- [15] Rai M, Ingle AP, Gaikwad S, Gupta I, Gade A, Silvério da Silva S. Nanotechnology based anti-infectives to fight microbial intrusions. *J Appl Microbiol* 2016. doi:10.1111/jam.13010.
- [16] Lapornik B, Prošek M, Wondra AG. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J Food Eng* 2005. doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.10.036.

- [17] Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, et al. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. J Food Drug Anal 2014. doi:10.1016/j.jfda.2013.11.001.
- [18] Negut I, Grumezescu V, Grumezescu AM. Treatment strategies for infected wounds. Molecules 2018. doi:10.3390/molecules23092392.
- [19] Wilkinson LJ, White RJ, Chipman JK. Silver and nanoparticles of silver in wound dressings: a review of efficacy and safety. J Wound Care 2011. doi:10.12968/jowc.2011.20.11.543.
- [20] Koduru JR, Kailasa SK, Bhamore JR, Kim KH, Dutta T, Vellingiri K. Phytochemical-assisted synthetic approaches for silver nanoparticles antimicrobial applications: A review. Adv Colloid Interface Sci 2018. doi:10.1016/j.cis.2018.03.001.
- [21] Durán N, Nakazato G, Seabra AB. Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles, and silver chloride nanoparticles: an overview and comments. Appl Microbiol Biotechnol 2016. doi:10.1007/s00253-016-7657-7.
- [22] Buszewski B, Railean-Plugaru V, Pomastowski P, **Rafińska K**, Szultka-Mlynska M, Golinska P, et al. Antimicrobial activity of biosilver nanoparticles produced by a novel *Streptacidiphilus durhamensis* strain. J Microbiol Immunol Infect 2018;51. doi:10.1016/j.jmii.2016.03.002.
- [23] Railean-Plugaru V, Pomastowski P, Wypij M, Szultka-Mlynska M, **Rafinska K**, Golinska P, et al. Study of silver nanoparticles synthesized by acidophilic strain of Actinobacteria isolated from the of Picea sitchensis forest soil. J Appl Microbiol 2016;120. doi:10.1111/jam.13093.
- [24] Buszewski B, Railean-Plugaru V, Pomastowski P, **Rafińska K**, Szultka-Mlynska M, Kowalkowski T. Antimicrobial effectiveness of bioactive silver nanoparticles synthesized by actinomycetes HGG16N strain. Curr Pharm Biotechnol 2017;18. doi:10.2174/1389201018666170104112434.
- [25] Hameed ASH, Karthikeyan C, Ahamed AP, Thajuddin N, Alharbi NS, Alharbi SA, et al. In vitro antibacterial activity of ZnO and Nd doped ZnO nanoparticles against ESBL producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. Sci Rep 2016. doi:10.1038/srep24312.
- [26] Railean-Plugaru V, Pomastowski P, **Rafinska K**, Wypij M, Kupczyk W, Dahm H, et al. Antimicrobial properties of biosynthesized silver nanoparticles studied by flow cytometry and related techniques. Electrophoresis 2016;37. doi:10.1002/elps.201500507.
- [27] Chen X, Schluesener HJ. Nanosilver : A nanoparticle in medical application 2008;176:1–12. doi:10.1016/j.toxlet.2007.10.004.
- [28] Buszewski B, **Rafińska K**, Pomastowski P, Walczak J, Rogowska A. Novel aspects of silver nanoparticles functionalization. Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp 2016;506. doi:10.1016/j.colsurfa.2016.05.058.
- [29] Rogowska A, **Rafińska K**, Pomastowski P, Walczak J, Railean-Plugaru V, Buszewska-Forajta M, et al. Silver nanoparticles functionalized with ampicillin. Electrophoresis 2017;38. doi:10.1002/elps.201700093.
- [30] Gambino M, Marzano V, Villa F, Vitali A, Vannini C, Landini P, et al. Effects of sublethal doses of silver nanoparticles on Bacillus subtilis planktonic and sessile cells. J Appl Microbiol 2015. doi:10.1111/jam.12779.
- [31] Yoon KY, Hoon Byeon J, Park JH, Hwang J. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. Sci Total Environ 2007. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.11.007.
- [32] **Rafińska K**, Pomastowski P, Buszewski B. Study of *Bacillus subtilis* response to different forms of silver. Sci Total Environ 2019;661:120–9. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.12.139.
- [33] Gunawan C, Teoh WY, Marquis CP, Amal R. Induced adaptation of *Bacillus* sp. to antimicrobial nanosilver. Small 2013. doi:10.1002/sml.201300761.
- [34] Eymard-Vernain E, Coute Y, Adrait A, Rabilloud T, Sarret G, Lelong C. The poly-gamma-glutamate of *Bacillus subtilis* interacts specifically with silver nanoparticles. PLoS One 2018;13:1–19. doi:10.1371/journal.pone.0197501.

- [35] Higgins D, Dworkin J. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiol Rev* 2012. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x.
- [36] Dholakiya RN, Kumar R, Mishra A, Mody KH, Jha B. Antibacterial and antioxidant activities of novel actinobacteria strain isolated from Gulf of Khambhat, Gujarat. *Front Microbiol* 2017;8:1–16. doi:10.3389/fmicb.2017.02420.
- [37] Janardhan A, Kumar AP, Viswanath B, Saigopal DVR, Narasimha G. Production of Bioactive Compounds by Actinomycetes and Their Antioxidant Properties. *Biotechnol Res Int* 2014. doi:10.1155/2014/217030.
- [38] Yuan YG, Peng QL, Gurunathan S. Effects of silver nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from mastitis-infected goats: An alternative approach for antimicrobial therapy. *Int J Mol Sci* 2017;18. doi:10.3390/ijms18030569.
- [39] Sahoo S, Rao KK, Suresh AK, Suraiskumar GK. Intracellular reactive oxygen species mediate suppression of sporulation in *Bacillus subtilis* under shear stress. *Biotechnol Bioeng* 2004. doi:10.1002/bit.20095.
- [40] Mohanta YK, Behera SK. Biosynthesis, characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles by *Streptomyces* sp. SS2. *Bioprocess Biosyst Eng* 2014. doi:10.1007/s00449-014-1205-6.
- [41] Kłodzińska E, Szumski M, Dziubakiewicz E, Hryniewicz K, Skwarek E, Janusz W, et al. Effect of zeta potential value on bacterial behavior during electrophoretic separation. *Electrophoresis* 2010. doi:10.1002/elps.200900559.
- [42] Hsueh YH, Lin KS, Ke WJ, Hsieh C Te, Chiang CL, Tzou DY, et al. The antimicrobial properties of silver nanoparticles in *Bacillus subtilis* are mediated by released Ag⁺ ions. *PLoS One* 2015. doi:10.1371/journal.pone.0144306.
- [43] Kittler S, Greulich C, Diendorf J, Köller M, Epple M. Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. *Chem Mater* 2010. doi:10.1021/cm100023p.
- [44] Reddy AS, Chen C-Y, Chen C-C, Jean J-S, Chen H-R, Tseng M-J, et al. Biological Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles Mediated by the Bacteria *Bacillus subtilis*. *J Nanosci Nanotechnol* 2010;10:6567–74. doi:10.1166/jnn.2010.2519.
- [45] Durán N, Marcato PD, De Conti R, Alves OL, Costa FTM, Brocchi M. Potential Use of Silver Nanoparticles on Pathogenic Bacteria, their Toxicity and Possible Mechanisms of Action. *J Braz Chem Soc* 2010. doi:10.1590/s0103-50532010000600002.
- [46] Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res* 2000. doi:10.1002/1097-4636(20001215)52:4<662::AID-JBM10>3.0.CO;2-3.
- [47] Milanowski M, Pomastowski P, Railean-Plugaru V, **Rafińska K**, Ligor T, Buszewski B. Biosorption of silver cations onto *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus casei* isolated from dairy products. *PLoS One* 2017;12. doi:10.1371/journal.pone.0174521.
- [48] Giansanti F, Panella G, Leboffe L, Antonini G. Lactoferrin from milk: Nutraceutical and pharmacological properties. *Pharmaceuticals* 2016. doi:10.3390/ph9040061.
- [49] Ward PP, Paz E, Conneely OM. Multifunctional roles of lactoferrin: A critical overview. *Cell Mol Life Sci* 2005. doi:10.1007/s00018-005-5369-8.
- [50] Ochoa TJ, Brown EL, Guion CE, Chen JZ, McMahon RJ, Cleary TG. Effect of lactoferrin on enteroaggregative E-coli (EAEC). *Biochem Cell Biol Biol Cell* 2006. doi:10.1139/006-053.
- [51] Tomita M, Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J Dairy Sci* 1991. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78608-6.
- [52] Hendrixson DR, Qiu J, Shewry SC, Fink DL, Petty S, Baker EN, et al. Human milk lactoferrin is a serine protease that cleaves Haemophilus surface proteins at arginine-rich sites. *Mol*

- Microbiol 2003. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03327.x.
- [53] Pomastowski P, Sprynskyy M, Žuvela P, **Rafińska K**, Milanowski M, Liu JJ, et al. Silver-Lactoferrin nanocomplexes as a potent antimicrobial agent. *J Am Chem Soc* 2016;138. doi:10.1021/jacs.6b02699.
- [54] Berlutti F, Morea C, Battistoni A, Sarli S, Cipriani P, Superti F, et al. Iron availability influences aggregation, biofilm, adhesion and invasion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2005. doi:10.1177/039463200501800407.
- [55] Sintubin L, De Windt W, Dick J, Mast J, Van Der Ha D, Verstraete W, et al. Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009. doi:10.1007/s00253-009-2032-6.
- [56] Matei A, Cornea CP, Matei S, Matei GM, Cogălniceanu G, Rodino S. Biosynthesis of silver nanoparticles using culture filtrates of lactic acid bacteria and analysis of antifungal activity. *Dig J Nanomater Biostructures* 2015.
- [57] Rezac S, Kok CR, Heermann M, Hutkins R. Fermented foods as a dietary source of live organisms. *Front Microbiol* 2018. doi:10.3389/fmicb.2018.01785.
- [58] Sanchez B, De Los Reyes-Gavilán CG, Margolles A, Gueimonde M. Probiotic fermented milks: Present and future. *Int J Dairy Technol* 2009. doi:10.1111/j.1471-0307.2009.00528.x.
- [59] Delgado S, Rachid CTCC, Fernández E, Rychlik T, Alegría Á, Peixoto RS, et al. Diversity of thermophilic bacteria in raw, pasteurized and selectively-cultured milk, as assessed by culturing, PCR-DGGE and pyrosequencing. *Food Microbiol* 2013. doi:10.1016/j.fm.2013.04.015.
- [60] von Neubeck M, Baur C, Krewinkel M, Stoeckel M, Kranz B, Stressler T, et al. Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *Int J Food Microbiol* 2015. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.001.
- [61] Railean-Plugaru V, Pomastowski P, Meller K, Złoch M, **Rafińska K**, Buszewski B, *Lactococcus lactis* as a safe and inexpensive source of bioactive silver composites 2017. doi:10.1007/s00253-017-8443-x.
- [62] Ozdemir KG, Yilmaz H, Yilmaz S. In vitro evaluation of cytotoxicity of soft lining materials on L929 cells by MTT assay. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater* 2009. doi:10.1002/jbm.b.31256.
- [63] Schedle A, Franz A, Rausch-Fan X, Spittler A, Lucas T, Samorapoompichit P, et al. Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements. *Dent Mater* 1998. doi:10.1016/S0300-5712(99)00018-4.
- [64] Buszewski B, Pomastowski P, **Rafińska K**, Railean-Plugaru V, 2016. Izolacja nowych szczepów bakterii kwasu mlekowego i sposób otrzymywania nanocząsteczek za pomocą tych szczepów oraz lecznicze zastosowanie takich nanocząstek srebra. Nr zgłoszenia: P. 418480.
- [65] Mazid M, Khan TA, Mohammad F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biol Med* 2011. doi:citeulike-article-id:10435815.
- [66] Silva LN, Zimmer KR, Macedo AJ, Trentin DS. Plant Natural Products Targeting Bacterial Virulence Factors. *Chem Rev* 2016. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00184.
- [67] Park WT, Arasu MV, Al-Dhabi NA, Yeo SK, Jeon J, Park JS, et al. Yeast extract and silver nitrate induce the expression of phenylpropanoid biosynthetic genes and induce the accumulation of rosmarinic acid in agastache rugosa cell culture. *Molecules* 2016. doi:10.3390/molecules21040426.
- [68] Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng* 2013. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014.
- [69] **Rafińska K**, Pomastowski P, Rudnicka J, Krakowska A, Maruška A, Narkute M, Buszewski B, Effect of solvent and extraction technique on composition and biological activity

- of *Lepidium sativum* extracts. Food Chem 2019, 289(15), 16-25
- [70] Buszewski B, **Rafińska K**, Cvetanović A, Walczak J, Krakowska A, Rudnicka J, et al. Phytochemical analysis and biological activity of *Lupinus luteus* seeds extracts obtained by supercritical fluid extraction. Phytochem Lett 2019;1–11. doi:10.1016/j.phytol.2019.02.014.
- [71] Wrona O, **Rafińska K**, Możeński C, Buszewski B. Supercritical carbon dioxide extraction of *Solidago gigantea* Ait.: Optimization at quarter-technical scale and scale up the process to half-technical plant. Ind Crops Prod 2019;130:316–24. doi:10.1016/j.indcrop.2018.12.050.
- [72] Radusiene J, Marska M, Ivanauskas L, Jakstas V, Karpaviciene B. Assessment of phenolic compound accumulation in two widespread goldenrods. Ind Crops Prod 2015. doi:10.1016/j.indcrop.2014.10.015.
- [73] Paun G, Neagu E, Albu C, Radu GL. *Verbascum phlomoides* and *Solidago virgaureae* herbs as natural source for preventing neurodegenerative diseases. J Herb Med 2016. doi:10.1016/j.hermed.2016.08.001.
- [74] Barrales FM, Silveira P, Barbosa P de PM, Ruviaro AR, Paulino BN, Pastore GM, et al. Recovery of phenolic compounds from citrus by-products using pressurized liquids — An application to orange peel. Food Bioprod Process 2018. doi:10.1016/j.fbp.2018.08.006.
- [75] Díaz-Reinoso B, Moure A, Domínguez H, Parajó JC. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. J Agric Food Chem 2006. doi:10.1021/jf052858j.
- [76] Murga R, Ruiz R, Beltran S, Cabezas JL. Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. J Agric Food Chem 2000. doi:10.1021/jf9912506.
- [77] Ranilla LG, Genovese MI, Lajolo FM. Isoflavones and antioxidant capacity of Peruvian and Brazilian lupin cultivars. J Food Compos Anal 2009. doi:10.1016/j.jfca.2008.06.011.
- [78] Siger A, Czubinski J, Kachlicki P, Dwiecki K, Lampart-Szczapa E, Nogala-Kalucka M. Antioxidant activity and phenolic content in three lupin species. J Food Compos Anal 2012. doi:10.1016/j.jfca.2011.10.002.
- [79] Cushnie TPT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. Int J Antimicrob Agents 2005. doi:10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002.
- [80] Cusido RM, Onrubia M, Sabater-Jara AB, Moyano E, Bonfill M, Goossens A, et al. A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of *Taxus* spp. Biotechnol Adv 2014. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.03.002.
- [81] Xing B, Yang D, Guo W, Liang Z, Yan X, Zhu Y, et al. Ag⁺ as a more effective elicitor for production of tanshinones than phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. Molecules 2015. doi:10.3390/molecules20010309.
- [82] Buszewski B, Pomastowski P, **Rafińska K**, 2017. Sposób otrzymania substancji bioaktywnych z *Lepidium sativum* oraz ich zastosowanie. Nr zgłoszenia: P.421739.
- [83] Krakowska A, **Rafińska K**, Walczak J, Kowalkowski T, Buszewski B. Comparison of various extraction techniques of *Medicago sativa*: Yield, antioxidant activity, and content of phytochemical constituents. J AOAC Int 2017;100. doi:10.5740/jaoacint.17-0234.
- [84] Al-Suod H, Ligor M, Rațiu I-A, **Rafińska K**, Górecki R, Buszewski B. A window on cyclitols: Characterization and analytics of inositols. Phytochem Lett 2017;20. doi:10.1016/j.phytol.2016.12.009.

