



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Poznań University of Life Sciences

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Autoreferat

Kamila Myszka

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Poznań 2017

1. Imię i nazwisko: Kamila Myszka

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

- 2008 – stopień doktora nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu; tytuł pracy doktorskiej: „Identyfikacja czynników morfologicznych i fizjologicznych odpowiedzialnych za zjawisko adhezji mikroorganizmów w warunkach głodowych”, promotor: dr hab. inż. Katarzyna Czaczyk
- 2003 – tytuł magistra inżyniera technologii żywności i żywienia, Wydział Technologii Żywności, Akademia Rolnicza w Poznaniu; tytuł pracy magisterskiej: „Biosynteza egzopolisacharydów i ich rola w adhezji *Bacillus megaterium* do powierzchni nieożywionych”, promotor: dr inż. Katarzyna Czaczyk

3. Informacje o zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- od 2008 do chwili obecnej – Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, adiunkt
- 2007 – 2008 - Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, asystent
- 2003 – 2007 – słuchacz czteroletniego Stacjonarnego Studium Doktoranckiego przy Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 4 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr. 65, poz. 595, z późn. zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Ingerencja w system *quorum sensing* jako strategia zapobiegająca tworzeniu się biofilmu i psuciu żywności przez *Pseudomonas fluorescens*

b) autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy

H 1. Myszka K., Czaczyk K. 2010. Mechanizm *quorum sensing* jako czynnik regulujący wirulencję bakterii gram-ujemnych. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 64: 582-589.

IF₂₀₁₀=0,511; MNiSW₂₀₁₆=15pkt

H 2. Myszka K., Czaczyk K. 2012. *N*-Acylhomoserine lactones (AHLs) as phenotype control factors produced by gram-negative bacteria in natural ecosystems. Polish Journal of Environmental Studies, 21: 15-21.

IF₂₀₁₂=1,111; MNiSW₂₀₁₆=15pkt

H 3. Myszk K., Schmidt M.T., Białas W., Olkiewicz M., Leja K., Czaczyk K. 2016. Role of gallic and *p*-coumaric acids in the AHL-dependent expression of *flgA* gene and in the process of biofilm formation in food-associated *Pseudomonas fluorescens* KM120. Journal of the Science of Food and Agriculture, 96: 4037-4047.

IF₂₀₁₆=2,463; MNiSW₂₀₁₆=35pkt

H 4. Myszk K., Schmidt M.T., Majcher M., Juzwa W., Olkiewicz M., Czaczyk K. 2016. Inhibition of *quorum sensing*-related biofilm formation of *Pseudomonas fluorescens* KM121 by *Thymus vulgare* essential oil and its major bioactive compounds. International Biodeterioration & Biodegradation, 114: 252-259

IF₂₀₁₆=2,962; MNiSW₂₀₁₆=30pkt

H 5. Myszk K., Schmidt M.T., Olejnik-Schmidt A.K., Leja K., Czaczyk K. 2014. Influence of phenolic acids on indole acetic acid production and on the type III secretion system gene transcription in food-associated *Pseudomonas fluorescens* KM05. Journal of Bioscience and Bioengineering, 118: 651-656.

IF₂₀₁₄=2,016; MNiSW₂₀₁₆=30pkt

H 6. Myszk K., Schmidt M.T., Majcher M., Juzwa W., Czaczyk K. 2017. β -Caryophyllene-rich pepper essential oils suppress spoilage activity of *Pseudomonas fluorescens* KM06 in fresh-cut lettuce. LWT-Food Science and Technology, 83: 118-126.

IF₂₀₁₇=2,329; MNiSW₂₀₁₆=35pkt

Sumaryczny IF prac wskazanych jako osiągnięcie: 11,392; suma punktów MNiSW₂₀₁₆: 160; liczba cytowań (WoS) 17

c) Omówienie celu naukowego wskazanego osiągnięcia, otrzymanych wyników wraz z przedstawieniem ich ewentualnego wykorzystania

W przemyśle spożywczym, zastosowanie nowoczesnych technologii, automatyzacja procesów produkcyjnych czy dobra organizacja produkcji, nie gwarantuje wytwarzania żywności wolnej od niepożądanych drobnoustrojów. O ile obecność niektórych mikroorganizmów chorobotwórczych i ich metabolitów została wyraźnie zredukowana lub zupełnie wyeliminowana w produktach gotowych, zanieczyszczenie żywności bakteriami saprofitycznymi jest ciągle nierozwiązanym problemem. Bakterie saprofityczne to grupa drobnoustrojów niepożądanych żywności, odpowiedzialna za psucie produktów spożywczych. Bezpośrednim efektem tego zjawiska jest zmiana tekstury, smaku, zapachu czy barwy żywności. Pomimo znacznego zróżnicowania filogenetycznego mikrobiomu poszczególnych produktów spożywczych, to przedstawiciele głównie rodzaju *Pseudomonas* decydują o tempie i charakterze zmian sensorycznych żywności.

Poziom zanieczyszczenia żywności bakteriami saprofitycznymi, w tym *Pseudomonas* spp., powinien być weryfikowany już w trakcie procesu produkcyjnego. Jednakże ograniczony dostęp do prostych i wiarygodnych zestawów poboru prób (zwłaszcza z linii

produkcyjnych) oraz metod analitycznych na tyle krótkich, aby istniała możliwość szybkiej korekty parametrów technologicznych w jednym cyklu produkcyjnym, sprawia, że oznaczanie poziomu zanieczyszczenia żywności bakteriami saprofitycznymi jest albo pomijane albo pozwala podjąć właściwe działania higienizacyjne i korygujące dopiero w kolejnym cyklu produkcyjnym lub nawet po kilku dniach (a więc po wytworzeniu i zapakowaniu już danej partii produktu). Bezpośrednią konsekwencją takiego postępowania jest zjawisko przedterminowego psucia się żywności, które według dobrze udokumentowanych oszacowań Organizacji Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (FAO), może osiągać wielkość nawet 25% produkcji globalnej. Obecność bakterii saprofitycznych w produktach spożywczych na poziomie powyżej 10^6 jtk w 1g lub 10^6 jtk w 1ml, może być również przyczyną chorób układu pokarmowego u konsumentów, szczególnie u osób w podeszłym wieku i dzieci. Warto podkreślić, że zgodnie z Rozporządzeniem 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady, ustanawiającym ogólne zasady prawa żywnościowego; *środek spożywczy jest uważany za niebezpieczny nie tylko wówczas, gdy jest szkodliwy dla zdrowia, ale również, gdy nie nadaje się do spożycia przez ludzi*. W tym rozumieniu żywność, zawierająca bakterie saprofityczne, to również żywność potencjalnie niebezpieczna dla konsumentów, a dążenie do ograniczenia rozwoju bakterii saprofitycznych w produktach spożywczych powinno mieć takie same znaczenie, co zabieg eliminowania w żywności drobnoustrojów chorobotwórczych. Dopiero takie podejście do kwestii jakości żywności w pełni zagwarantuje unikanie kosztów zwrotu artykułu, utraty wiarygodności rynkowej przedsiębiorstwa, oraz przede wszystkim kosztów, których nie sposób wyrazić jakościowo, jak zdrowie człowieka.

Komórki *Pseudomonas* spp. to przede wszystkim mikroflora epifityczna roślin. Mogą one być obecne również w glebie, płytko występujących wodach gruntowych czy wtórnie zakażonej wodzie wodociągowej. Zanieczyszczona mikrobiologicznie woda oraz surowiec, który poddany został niewłaściwej obróbce wstępnej, to z kolei główne źródła transmisji *Pseudomonas* spp. do produktu gotowego.

W produktach spożywczych, komórki *Pseudomonas* spp. początkowo występują w stanie metabolicznego uśpienia. Dopiero dostęp do składników odżywczych i następnie katabolizm heksoz czy aminokwasów indukuje proces intensywnej proliferacji komórek. Po osiągnięciu pewnej krytycznej liczebności, komórki *Pseudomonas* spp. regulują swój metabolizm cząsteczkami autoinduktorów mechanizmu *quorum sensing* (tzw. sygnalizatora zagęszczenia). Autoinduktory *quorum sensing* pośredniczą w regulacji ekspresji wielu genów. Autoinduktory *quorum sensing*, do których należą głównie laktony *N*-acyl-L-homoseryny (AHL), kwas 3-indoliloctowy (IAA) czy przypominające antybiotyki cząsteczki chinolonowe (PQS), syntetyzowane są przez drobnoustroje w wyniku aktywności białek z rodziny syntaz LuxI (genom bakteryjny może zawierać ponad 100 homologów tych białek). Autoinduktory wiążą się z białkiem kodowanym przez gen *luxR* lub gen *luxR-type*, co w konsekwencji umożliwia transkrypcję odpowiednich genów docelowych. U *Pseudomonas* spp. blisko 616 genów regulowanych jest przez sygnalizator zagęszczenia. Są to geny kodujące białka uczestniczące w procesach denitryfikacyjnych, w procesach wirulencji, tworzeniu się biofilmu, oporności komórek na biocydy, podziałach komórkowych czy biosyntezie białek szoku termicznego. Warto podkreślić, że system *quorum sensing* ma szczególne znaczenie w opanowywaniu przez bakterie nowych nisz ekologicznych i

precyzuje do jakich warunków środowiskowych mogą zaadoptować się poszczególne drobnoustroje. Udowodniono również, że mechanizm *quorum sensing* należy do jednych z głównych czynników, które ze strony komórek bakteryjnych decydują o szybkości i specyfice procesu psucia się żywności (Suga i Smith, 2003).

Sygnalizator zagęszczenia (*quorum sensing*) stwierdzono u bakterii gram-ujemnych i bakterii gram-dodatnich. **Celem pracy było jednak poszerzenie wiedzy na temat systemu *quorum sensing* i możliwości jego blokowania u gram-ujemnych bakterii występujących w żywności.** Uzyskane wyniki zebrałam w cykl monotematycznych publikacji, a kolejność ich prezentacji w autoreferacie wynika z merytorycznej zawartości. Na szczególnie podkreślenie zasługuje również fakt, że opublikowane rezultaty tych badań należą do bardzo nielicznych, które opisują mechanizm *quorum sensing* u szczepów dzikich *Pseudomonas* spp., wyizolowanych z żywności i z środowiska produkcyjnego. Przedmiotem badań zdecydowanej większości ośrodków naukowych, był mechanizm *quorum sensing* drobnoustrojów referencyjnych o znaczeniu typowo klinicznym, lub szczepów będących przyczyną zakażeń wewnątrzszpitalnych. Zapewnienie jakości i bezpieczeństwa mikrobiologicznego produktów spożywczych, wymaga szczegółowej obserwacji mechanizmu *quorum sensing*, ale u gatunków bakterii przenoszonych przez żywność, które stanowią realny problem w przemyśle spożywczym.

W pracy założono, że ingerencja w system *quorum sensing* drobnoustrojów, może w przyszłości ułatwić opracowanie skutecznych środków myjących powierzchnie i urządzenia produkcyjne. Ingerencja w system *quorum sensing* może przyczynić się także do odkrycia nowych klas środków konserwujących żywność, nie działających na komórki typowo bójczo, lecz istotnie ograniczających ich aktywność metaboliczną. Takie podejście pozwoli wyeliminować ryzyko selekcji form opornych. Eksperymentalna weryfikacja powyższych hipotez naukowych, może stanowić również podstawę do opracowania ważnego etapu w systemie kombinowanego utrwalania produktów spożywczych (znanego pod nazwą „teorii płotkowej”; j. ang. *hurdle technology*).

Mechanizm *quorum sensing* jest stosunkowo nowo odkrytym procesem biologicznym. Zidentyfikowano go dopiero u około 26 gatunków bakterii gram-ujemnych. Z powyższych przyczyn, pierwszym etapem pracy były szczegółowe studia literaturowe. Umożliwiły one poszerzenie wiedzy na temat charakterystyki procesu *quorum sensing*, a także roli jaką pełni ten system w regulacji poszczególnych aktywności fizjologicznych komórek. Jest to wiedza, którą można ekstrapolować na warunki przemysłowe. Studia literaturowe stały się podstawą do przygotowania następujących prac przeglądowych: „**Mechanizm *quorum sensing* jako czynnik regulujący wirulencję bakterii gram-ujemnych**” (publikacja H1) oraz „***N*-Acylhomoserine lactones (AHLs) as phenotype control factors produced by gram-negative bacteria in natural ecosystems**” (publikacja H2).

Opierając się na dostępnej literaturze, w publikacjach H1 i H2 opisano środowiskowe i komórkowe determinanty syntezy autoinduktorów AHL u wybranych drobnoustrojów. W pracach starano się zwrócić uwagę na profil związków AHL, wydzielanych przez określone szczepy bakteryjne i pośrednio analizowano czy synteza konkretnego rodzaju autoinduktora jest właściwością jedynie szczepu bakteryjnego czy jest to raczej aktywność występująca u innych drobnoustrojów. Przegląd literatury pod tym kątem uświadomił potrzebę opracowania nowej procedury detekcji cząsteczek AHL drobnoustrojów. Było to

jednym z głównych celów późniejszych etapów pracy, a rezultaty tych badań przedstawiono między innymi w **publikacji H3**. Warto podkreślić, że dotychczas stosowane metody detekcji cząsteczek sygnalizacyjnych, oparte na hodowli szczepów wskaźnikowych (*Agrobacterium tumefaciens* ATCC 51350 oraz *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532) czy technice chromatografii cienkowarstwowej, gwarantowały naukowcom jedynie wstępną ocenę zdolności komórek do syntezy autoinduktorów. Stąd poszukiwania w literaturze nieswoistych/bardziej uniwersalnych czynników sygnalizacyjnych AHL, stymulujących taką samą aktywność fizjologiczną u różnych gatunków drobnoustrojów, okazały się na tym etapie pracy bardzo trudne.

Główny nacisk w pracach przeglądowych położono jednak na rozdziały, w których opisano możliwość regulacji przez system *quorum sensing* cech fenotypowych bakterii. W tych pracach zwrócono szczególną uwagę na proces tworzenia się biofilmu przez *Pseudomonas aeruginosa* oraz syntezę czynników wirulencji przez drobnoustroje chorobotwórcze roślin z gatunków: *Erwinia chrysanthemi*, *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* oraz *Agrobacterium tumefaciens*. Choć proces patogenezy jest zjawiskiem bardzo złożonym, wymagającym udziału wielu czynników, większość jego determinantów podlega kontroli przez autoinduktory *quorum sensing*. W procesie tworzenia się biofilmu, synteza autoinduktorów AHL, inicjuje między innymi proces adhezji pojedynczych drobnoustrojów do płaszczyzn stałych. Z kolei, wraz ze wzrostem czasu kontaktu komórki bakteryjnej z powierzchnią abiotyczną, cząsteczki AHL decydują o strukturze dojrzałej błony biologicznej.

U fitopatogenów *Erwinia* spp. czy *Pantoea* spp., synteza np. cząsteczek C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL oraz C10-HSL warunkuje między innymi sekrecję kapsularnych egzopolisacharydów, które mogą odkładać się w przestrzeni pomiędzy rdzeniem a kambium roślin, utrudniając dystrybucję wody i rozpuszczonych w niej soli mineralnych. Jest to jedna z przyczyn werciliozy roślin, choroby której objawem jest gwałtowne więdnienie liści.

Biorąc pod uwagę eksperymenty, które wykonano w późniejszych etapach pracy, łącznie z wyborem i selekcją szczepów bakteryjnych do badań, napisanie prac przeglądowych okazało się bardzo pomocne. Stały się one impulsem do podjęcia prób nad ingerencją w mechanizm *quorum sensing* drobnoustrojów przenoszonych przez żywność i zastosowaniu tego zabiegu do hamowania potencjału komórek do tworzenia się biofilmu na powierzchniach stałych (**publikacja H3 i H4**) oraz zaburzania trzeciego systemu sekrecyjnego bakterii, odpowiedzialnego między innymi za zjawisko mokrej zgnilizny sałaty lub kapusty w produktach o minimalnym stopniu przetworzenia (**publikacja H5 i H6**).

W literaturze przedmiotu brakuje informacji opisujących mechanizm *quorum sensing* u saprofitycznych przedstawicieli *Pseudomonas* spp. Stąd jako drobnoustroje modelowe w badaniach zastosowano 4 szczepy psychrotrofowe z gatunku *Pseudomonas fluorescens*, różniące się źródłem izolacji. Szczepy oznaczono odpowiednio symbolami KM05, KM06, KM120 i KM121. Rezultaty badań z wykorzystaniem tych szczepów opisano w **publikacjach H3, H4, H5 i H6**. Wszystkie szczepy to izolaty własne, które zostały zidentyfikowane techniką amplifikacji sekwencji kodującej 16S rRNA i były zdolne do wzrostu w temperaturze 15°C. Źródłem izolacji szczepów były wymazy pobrane z powierzchni systemu dystrybucji mleka w jednej z mleczarni, mieszczącej się na terenie województwa wielkopolskiego oraz komercyjnie dostępne cięte sałaty rzymskie oraz surówki na bazie kapusty białej. Szczepy zostały zdeponowane w Kolekcji Drobnoustrojów w Katedrze

Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Do wyboru do badań gatunku *Pseudomonas fluorescens*, skłoniły mnie wcześniejsze prace, które wykonałam w ramach dwóch projektów badawczych (projektu „Nowa żywność bioaktywna o zaprogramowanych właściwościach prozdrowotnych” oraz projektu „Drogi powstawania związków zapachowych w polskich regionalnych produktach mleczarskich wytwarzanych według tradycyjnej technologii. Wpływ mikroflory oraz sposobu otrzymywania”). W większości prób, stanowiących przedmiot pracy w grantach, grupa gram-ujemnych bakterii psychrotrofowych, reprezentowana była licznie przez gatunek *Pseudomonas fluorescens*. Świadczyć to może o wysokiej oporności tego gatunku na powszechnie wykorzystywane w przemyśle środki konserwujące żywność i zabiegi mycia powierzchni produkcyjnych.

System *quorum sensing* odgrywa istotną rolę w procesie adhezji drobnoustrojów do powierzchni abiotycznych czy zjawisku psucia się żywności, stąd identyfikacja sposobów zakłócania tego mechanizmu może okazać się ważna dla przemysłu spożywczego. Udowodniono, że wiele naturalnych związków jest zdolnych do inhibicji mechanizmu *quorum sensing*. Powyższa aktywność przeciwdrobnoustrojowa może przejawiać się na drodze: (i) redukcji aktywności syntazy autoinduktorów; (ii) zahamowania produkcji autoinduktorów lub zredukowania wydajności tego procesu; (iii) degradacji cząsteczek autoinduktorów; (iv) zastępowania autoinduktorów wytwarzanych przez drobnoustroje syntetycznymi substancjami o podobnej strukturze chemicznej. Spośród różnych możliwości ingerowania w system *quorum sensing*, hamowanie syntezy cząsteczek autoinduktorów, jest uznawane za najbardziej obiecującą strategię efektywnego eliminowania drobnoustrojów niepożądanych z żywności i środowiska produkcyjnego.

Każdy ze związków wykorzystywanych do hamowania syntezy autoinduktorów powinien charakteryzować się następującymi właściwościami: (i) powinny być to substancje o małej masie cząsteczkowej, selektywnie wpływające na stopień ekspresji genów; (ii) powinny być to substancje wykazujące specyficzność względem regulatorów *quorum sensing*, oraz (iii) powinny być to substancje chemicznie stabilne w matrycy żywności czy projektowanych preparatach. Potencjalne inhibitory mechanizmu *quorum sensing* *Pseudomonas* spp. nie powinny również wykazywać działania cytotoksycznego i genotoksycznego w odniesieniu do ludzkich komórek układu pokarmowego. **Wymienione wyżej kryteria inhibitorów *quorum sensing* mogą spełniać kwasy fenolowe i inne związki bioaktywne, obecne między innymi w olejkach eterycznych z roślin, ale szczegółowe badania w tym zakresie nie zostały dotąd podjęte. W związku z powyższym, w kolejnych etapach pracy podjęto się próby rzeczywistej oceny potencjału wybranych kwasów fenolowych i olejków eterycznych z roślin przyprawowych do ingerencji w bakteryjny system *quorum sensing*. Rezultaty interdyscyplinarnych badań przedstawiono w czterech publikacjach, oznaczonych w autoreferacie odpowiednio symbolami H3, H4, H5 i H6.**

W pracy zatytułowanej „**Role of gallic and *p*-coumaric acids in the AHL-dependent expression of *flgA* gene and in the process of biofilm formation in food-associated *Pseudomonas fluorescens* KM120**” (publikacja H3), potwierdzono aktywność przeciw-*quorum sensing* i w konsekwencji, przeciw-adhezyjną kwasów: galusowego i *p*-kumarowego. W pracy przeprowadzono wielopłaszczyznowe doświadczenia, oceniające zdolność wybranych stężeń kwasów fenolowych do hamowania syntezy cząsteczek AHL u *Pseudomonas fluorescens* KM120. Określono również zależność pomiędzy zmianami

syntezy cząsteczek AHL, ekspresji genu *flgA*, a zdolnością do tworzenia się biofilmu na powierzchni stali nierdzewnej (typ 304L) przez badane drobnoustroje. Gen *flgA* *Pseudomonas fluorescens* koduje białka, odpowiedzialne za tworzenie wici. Jak wynika z dostępnej literatury, obecność tych organelli gwarantuje komórkom, nie tylko efektywne zbliżenie się do powierzchni docelowych, ale również trwałe w nich zakotwiczenie. Biosynteza wici u *Pseudomonas* spp. jest regulowana autoinduktorami 3-okso-C6-HSL.

Na tym etapie pracy, wszystkie doświadczenia, przeprowadzono w układzie, który imituje systemy transportu mleka w mleczarniach i stąd umożliwia odtworzenie warunków *in vivo* formowania się biofilmu *Pseudomonas fluorescens* KM120. Układ doświadczalny zapewnił również stałe napowietrzenie hodowli (na poziomie 0,53 l/h) oraz stałą wartość pH pożywki (7,0), co zgodnie z doświadczeniami przeprowadzonymi przez Horswill i wsp. (2007) stymuluje u drobnoustrojów syntezę autoinduktorów *quorum sensing*.

Wykorzystując metodę spektrofotometryczną zaproponowaną przez Blosser i Gray (2000), w pracy wykazano wpływ wytypowanych stężeń kwasów fenolowych w pożywce hodowlanej na zmianę w syntezie AHL u drobnoustrojów. Stężenie kwasu *p*-kumarowego na poziomie 120 µmol/l oraz stężenie kwasu galusowego na poziomie 240 µmol/l istotnie zmniejszało wydajność syntezy AHL u *Pseudomonas fluorescens* KM120. Było to szczególnie widoczne w 48 h i 72 h doświadczenia. Do potwierdzenia aktywności przeciw-*quorum sensing* kwasu *p*-kumarowego oraz kwasu galusowego, wykorzystano technikę chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS). Zagwarantowała ona scharakteryzowanie całego profilu autoinduktorów AHL *Pseudomonas fluorescens* KM120. Oprócz cząsteczek 3-okso-C6-HSL (które kontrolują syntezę wici), w próbach zidentyfikowano również cząsteczki 3-hydroksy-C6-HSL oraz 3-hydroksy-C8-HSL (które kontrolują syntezę fenazyny – wielopierścieniowego związku chemicznego z grupy barwników azynowych). Warto podkreślić, że nie wszystkie cząsteczki AHL są dostępne komercyjnie. Trudno również prognozować jakie autoinduktory mogą w danych warunkach syntetyzować drobnoustroje. Stąd opracowanie procedury detekcji cząsteczek AHL systemem LC-MS, uważam za istotne osiągnięcie tej pracy.

W pracy, zmiany w syntezie cząsteczek 3-okso-C6-HSL pod wpływem wybranych stężeń kwasów *p*-kumarowego i galusowego, skonfrontowano również ze zmianami poziomu ekspresji genu *flgA*. Przeprowadzenie łańcuchowej reakcji polimerazy z analizą ilościową w czasie rzeczywistym (RT-qPCR), potwierdziło wpływ zmian w syntezie 3-okso-C6-HSL na ekspresję genu *flgA* u *Pseudomonas fluorescens* KM120. Bezpośrednim rezultatem zmian na poziomie molekularnym był obniżony potencjał *Pseudomonas* spp. do adhezji do powierzchni modelowej. Komórki z zaburzonym systemem *quorum sensing* nie były zdolne do trwałej kolonizacji powierzchni stali nierdzewnej. We wszystkich wariantach doświadczenia pod mikroskopem fluorescencyjnym, zaobserwowano jedynie obecność pojedynczych, bardzo nielicznych drobnoustrojów na powierzchni modelowej.

Podsumowując, za główne osiągnięcie tego etapu pracy uważam:

- konstrukcję układu doświadczalnego, imitującego warunki przemysłowe i przeprowadzenie w nim badań nad potencjałem wybranych stężeń kwasów fenolowych do ingerencji z bakteryjnym systemem *quorum sensing*;
- opracowanie schematu analitycznego, łączącego metodę spektrofotometryczną ze szczepami wskaźnikowymi *Chromobacterium violaceum* z techniką LC-MS. Schemat

analityczny umożliwił precyzyjną ocenę aktywności przeciw-*quorum sensing* badanych stężeń kwasów fenolowych;

- zaproponowanie alternatywnego wykorzystania kwasów fenolowych jako biocydów. Substancje te odznaczają się potencjałem do hamowania syntezy AHL i w konsekwencji mogą wyraźnie ograniczyć proces kolonizacji powierzchni użytkowych przez drobnoustroje. Preparaty myjące, suplementowane kwasami fenolowymi mogłyby znaleźć zastosowanie w przemyśle spożywczym, głównie mleczarskim. Należy bowiem podkreślić, że śladowe ilości kwasów fenolowych nie wpływają na zmianę zapachu i tekstury produktów mlecznych, nawet po ich bezpośrednim wprowadzeniu do masy przerabianego surowca (El-Nagga i El-Tawab, 2012).

Rezultaty doświadczeń nad aktywnością przeciw-*quorum sensing* syntetycznych kwasów fenolowych, zachęciły do kontynuacji tego tematu badawczego i poszukiwań innych czynników, głównie naturalnych, które mogą również ingerować w bakteryjny system *quorum sensing*. W pracy wykorzystano w tym celu olejek eteryczny, otrzymany z suszonych liści *Thymus vulgare*, a rezultaty tych doświadczeń opisano w publikacji „**Inhibition of quorum sensing-related biofilm of *Pseudomonas fluorescens* KM121 by *Thymus vulgare* essential oil and its major bioactive compounds**” (publikacja H4). Olejek eteryczny z *Thymus vulgare* to wieloskładnikowa mieszanina, w której w zależności od odmiany rośliny, mogą dominować związki monoterpenowe i seskwiterpenowe. W skład olejku eterycznego może wchodzić od kilku do nawet kilkudziesięciu różnych związków, przy czym dominują zwykle 1 - 3 związki (Bakkali i wsp., 2008). Co warto podkreślić, składniki olejku eterycznego mogą zaburzać system *quorum sensing* bakterii. Wyniki badań dokowania molekularnego, przeprowadzone przez Kumar i wsp. (2015) wskazują, że może odbywać się to na drodze związania pojedynczego fitozwiązku z olejku eterycznego z receptorem autoinduktorów *quorum sensing* lub poprzez zaburzenia w syntezie samych autoinduktorów. Zjawisko to skutkuje dalej ograniczeniem poziomu ekspresji wybranych genów.

W niniejszej pracy oceniono potencjał przeciw-*quorum sensing* olejku eterycznego z tymianku i jego bioaktywnych składników względem modelowego szczepu *Pseudomonas fluorescens* KM121. W pracy oceniono wpływ subinhibicyjnych stężeń olejku eterycznego, syntetycznego tymolu i syntetycznego karwakrolu na biosyntezę autoinduktorów AHL, ruchliwość komórek, ekspresję genu *flgA* oraz tworzenie się biofilmu przez badany drobnoustrój.

W doświadczeniach wykorzystano olejek eteryczny z suszonych liści tymianku, który wyekstrahowany został metodą hydrodestylacji w aparacie Derynga. Przeprowadzona następnie analiza składu chemicznego olejku eterycznego metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas, wykazała obecność 21 związków, przy czym to jedynie tymol, karwakrol i *p*-cymen były substancjami dominującymi. Ich udział w badanym olejku eterycznym, wyniósł odpowiednio 55,42 %, 6,84 % oraz 5,33 %. Ponieważ *p*-cymen nie wykazuje aktywności przeciwdrobnoustrojowej (prawdopodobnie ze względu na brak grupy hydroksyfenolowej), w tej pracy do dalszych doświadczeń wyselekcjonowany został jedynie tymol i karwakrol jako potencjalny czynnik ingerujący w bakteryjny system *quorum sensing*.

Ważnym etapem powyższej pracy było sprecyzowanie dawek badanych czynników, jakie powinny zostać użyte we wszystkich doświadczeniach, aby możliwe było przeprowadzenie oceny ich rzeczywistej aktywności przeciw-*quorum sensing* względem *Pseudomonas fluorescens* KM121. W tym celu, dla wszystkich czynników wyznaczono stężenia subinhibicyjne, których aktywność *in vivo* w komórkach może być rozpatrywana w aspekcie zbliżonym do poantybiotykowego efektu. Bezpośrednie skutki tego zjawiska można oceniać *in vitro*. Do wyznaczenia subinhibicyjnych stężeń tymolu, karwakrolu oraz olejku eterycznego z tymianku, zastosowano dwuetapową procedurę badawczą, obejmującą: metodę testu szeregowego, rekomendowanego przez Clinical and Laboratory Standards Institute, oraz barwienie komórek odczynnikiem Redox-SensorTM Green i jodkiem propidyny i następnie analiza całej populacji komórek techniką cytometrii przepływowej. Warto podkreślić, że analiza cytomeryczna umożliwia klasyfikację całej populacji komórek na frakcje komórek żywych, frakcję komórek uszkodzonych lub/i o obniżonym potencjale metabolicznym, oraz frakcję komórek martwych. Jest to więc poziom oceny wpływu danego czynnika przeciwdrobnoustrojowego na komórki, nie osiągalny dla metod konwencjonalnych i pozwala wyznaczyć stężenia maksymalizujące efekt przeciw-*quorum sensing* drobnoustrojów (a więc stężenia czynników, przy których nie dominuje subpopulacja komórek martwych). W pracy, połączenie obu różnych technik, w jeden protokół analityczny zagwarantowało wyznaczenie właściwego stężenia subinhibicyjnego olejku eterycznego i jego bioaktywnych składników. Dla olejku eterycznego z *Thymus vulgare* była to wartość 20 µl/ml, dla karwakrolu – 2,0 µl/ml, a dla tymolu – 4,0 µl/ml.

Do oceny wpływu subinhibicyjnych stężeń olejku eterycznego z tymianku, oraz syntetycznego tymolu i karwakrolu, na syntezę autoinduktorów AHL u badanych drobnoustrojów, zastosowano sprawdzone we wcześniejszych etapach pracy dwie metody: spektrofotometryczną według Blosser i Gray (2000) oraz metodę LC-MS. W tej pracy narażenie komórek *Pseudomonas fluorescens* KM121 na działanie wyselekcjonowanych stężeń wszystkich czynników, skutkowało obniżeniem lub zahamowaniem syntezy autoinduktorów *quorum sensing*. Było to widoczne szczególnie w 72 h trwania hodowli. W próbach z wcześniejszych etapów inkubacji (tj. w 24h i 48h), zidentyfikowano cząsteczkę 3-hydroksy-C8-HSL. W próbach kontrolnych z kolei, na profil autoinduktorów *Pseudomonas fluorescens* KM121, składały się następujące elementy: 3-hydroksy-C6-HSL, 3-okso-C6-HSL, C6-HSL, oraz 3-hydroksy-C8-HSL. W 96h inkubacji, komórki *Pseudomonas fluorescens* KM121 występowały już w fazie zamierania, w której rozpoczyna się proces mineralizacji autoinduktorów. To zjawisko jest spowodowane aktywnością enzymu acylazy AHL. Enzym przerywa wiązanie amidowe w autoinduktorach. Uwolniony rodnik acylowy i cząsteczka L-homoseryny podlegają dalszej mineralizacji. Homolog acylazy AHL został zidentyfikowany przez Lin i wsp. (2003) w genomie *Pseudomonas fluorescens* i innych zsekwencjonowanych gatunków *Pseudomonas* spp.

Stwierdzenie zaburzeń w syntezie cząsteczek C6-HSL oraz 3-okso-C6-HSL pod wpływem subinhibicyjnych stężeń olejku eterycznego z tymianku, syntetycznego tymolu i karwakrolu, zmotywowało dalej do podjęcia prób oceny wpływu tego zjawiska na ruchliwość komórek i ocenę poziomu ekspresji genu *flgA* techniką RT-qPCR. Do oceny ruchliwości komórek zastosowano podłoże tryptozowo-sojowe suplementowane agarem bakteriologicznym w ilości 0,2 %. Wyznaczone stężenia subinhibicyjne wszystkich

czynników istotnie hamowały ruchliwość komórek i powodowały zmniejszenie ekspresji genu *flgA* u drobnoustrojów. Warto podkreślić, że w próbach kontrolnych, gdzie zastosowano dodatek do hodowli syntetycznych cząsteczek C6-HSL oraz 3-okso-C6-HSL, odnotowano wyraźną ruchliwość komórek oraz nadekspresję genu *flgA*.

Ostatnim elementem tego etapu pracy była weryfikacja wpływu zaburzeń w syntezie autoinduktorów, na zjawisko tworzenia się biofilmu *Pseudomonas fluorescens* KM121. Powierzchnię modelową do badań stanowiły płytki ze stali nierdzewnej typ 316L. W pracy, po ekspozycji komórek na wybrane stężenia syntetycznego tymolu i karwakrolu oraz olejku eterycznego z *Thymus vulgaris*, zaobserwowano zahamowanie zdolności *Pseudomonas fluorescens* KM121 do formowania biofilmu na modelowej powierzchni abiotycznej. Wynik ten korespondował między innymi z rezultatem badań transkryptomowych nad poziomem ekspresji genu *flgA*.

Podsumowując, za główne osiągnięcie tego etapu pracy uważam:

- zaproponowanie nowego protokołu analitycznego do wyznaczania subinhibicyjnych stężeń czynników przeciwdrobnoustrojowych;
- wskazanie tymolu i karwakrolu jako tych składników olejku eterycznego z *Thymus vulgaris*, które odznaczają się potencjałem do ingerencji w bakteryjny system *quorum sensing*;
- zastosowanie hodowli *Pseudomonas fluorescens* KM121, prowadzonych na pożywkach suplementowanych syntetycznymi cząsteczkami autoinduktorów AHL, jako prób kontrolnych. Pozwoliło to zweryfikować wpływ mechanizmu *quorum sensing* na metabolizm drobnoustrojów;
- podkreślenie aplikacyjnego potencjału olejku eterycznego z *Thymus vulgaris*, bogatego w tymol i karwakrol.

W kolejnym etapie pracy do doświadczeń wykorzystano szczepy *Pseudomonas fluorescens* KM05 i KM06 (**publikacja H5 i H6**). Szczepy wyselekcjonowano z zepsutych produktów spożywczych pochodzenia roślinnego. U tych mikroorganizmów, proces patogenezy jest ściśle związany z trzecim typem sekrecyjnym (TTSS, *j. ang. type three secretion system*). System TTSS jest odpowiedzialny za jednoetapowy transport białek o strukturze monomerów bezpośrednio do wnętrza komórek eukariotycznych. W literaturze system ten nazywany jest często „molekularną strzykawką”, gdyż po odebraniu odpowiedniego chemicznego sygnału, budowany jest na powierzchni komórki rodzaj igły, łączącej komórkę drobnoustroju z komórką gospodarza. Przez powstały kanał, wstrzykiwane są do cytoplazmy zarówno niektóre białka strukturalne aparatu, jak i białko efektorowe. To białka efektorowe systemu TTSS, zmieniają procesy metaboliczne komórek gospodarza w kierunku korzystnym dla drobnoustroju, a wizualnym efektem tych zmian jest maceracja tkanki roślinnej. Dla komórek *Pseudomonas fluorescens*, czynnikiem sygnalizacyjnym aparatu TTSS jest kwas 3-indoliloctowy (IAA). Cząsteczki IAA to kolejny rodzaj autoinduktorów mechanizmu *quorum sensing* *Pseudomonas fluorescens* (Lee i Lee, 2010).

Na tym etapie pracy, skupiono się na ocenie możliwości zastosowania syntetycznych kwasów fenolowych do hamowania produkcji cząsteczek IAA, i w konsekwencji do obniżonej ekspresji genu *ttss*, kodującego białko strukturalne aparatu TTSS u *Pseudomonas fluorescens* KM05. Rezultaty tych badań przedstawiono w publikacji

„Influence of phenolic acids on indole acetic acid production and on the type III secretion system gene transcription in food-associated *Pseudomonas fluorescens* KM05” (publikacja H5). W doświadczeniach wykorzystano następujące rodzaje kwasów fenolowych: galusowy, chlorogenowy, ferulowy, oraz *p*-kumarowy. Powyższe związki mają udowodnioną naukowo aktywność przeciwdrobnoustrojową, ale zwykle w wysokich stężeniach. Aktywność ta, związana jest bezpośrednio z inhibicją wzrostu fitopatogenów (przez zablokowanie syntezy w komórkach kwasów nukleinowych oraz metabolizmu energetycznego) lub z modulacją aktywności fizjologicznej samych komórek (Cushnie i Lamb, 2005). Jednakże problemy w ustaleniu wysokości minimalnego stężenia bójczego (MBC) kwasów fenolowych dla różnych szczepów tego samego gatunku, zmotywowały do zastosowania w doświadczeniach takich stężeń kwasów fenolowych, które nie będą bakteriobójcze dla *Pseudomonas fluorescens* KM05, ale istotnie wpłyną na jego fizjologię, w tym na system *quorum sensing*.

W pracy oceniono dynamikę wzrostu *Pseudomonas fluorescens* KM05 narażonych na działanie wybranych stężeń kwasów fenolowych (tj. 0,002, 0,02, 0,04, oraz 0,2μg/ml). Do monitoringu przyrostu liczebności komórek, zastosowano metodę płytkową Kocha, a czasy trwania poszczególnych faz rozwojowych komórek określono za pomocą programu komputerowego Bacterial Growth Kinetics (Raleigh, USA). Poszczególne parametry wzrostu komórek obliczono, po uprzednim dopasowaniu otrzymanych wyników do rozkładu teoretycznego Gompertza. W niniejszej pracy, jedynie stężenie 0,2μg/ml kwasów fenolowych w pożywce, okazało się bójcze dla komórek *Pseudomonas fluorescens* KM05. Przy zawartości fitozwiązków w medium hodowlanym na poziomie 0,02 oraz 0,04μg/ml, zaobserwowano wydłużenie się lag-fazy oraz fazy logarytmicznego wzrostu komórek w porównaniu z próbą kontrolną. Powyższą zależność stwierdzono dla wyselekcjonowanych stężeń kwasów chlorogenowego i ferulowego. W tych doświadczeniach odnotowano również opóźnienie rozpoczęcia się fazy stacjonarnej wzrostu komórek, a więc fazy, w której obserwuje się zdolność fitopatogenów do wzmożonej syntezy białek strukturalnych i efektorowych aparatu TTSS. Istotnych zmian w fizjologii wzrostu *Pseudomonas fluorescens* KM05, nie zaobserwowano przy zawartości kwasów fenolowych w medium hodowlanym na poziomie 0,002μg/ml. Zmian w długości faz rozwojowych *Pseudomonas fluorescens* KM05, nie stwierdzono również po narażeniu komórek na działanie kwasu galusowego i kwasu *p*-kumarowego w całym zakresie badanych stężeń.

W niniejszej pracy, równolegle z wyznaczeniem fizjologii wzrostu drobnoustrojów, przeprowadzono badania, oceniające dynamikę syntezy autoinduktorów IAA przez komórki. Do realizacji tego zadania badawczego wykorzystano dwie metody: bioluminescencyjną według Bassler i wsp. (1997) ze szczepami wskaźnikowymi *Vibrio harveyi* BB152 i BB170 oraz spektrofotometryczną z odczynnikiem Salkowskiego, zaproponowaną przez Patten i Glick (1996). Metodę bioluminescencyjną, wykorzystano w badaniach przesiewowych do szybkiej identyfikacji zmian w wydajności syntezy cząsteczek sygnalizacyjnych IAA. Metoda ta opiera się na ocenie intensywności luminescencji *Vibrio harveyi*, wywołanej przez interakcje cząsteczek IAA z kinazą pirogronianową I tych szczepów. Zjawisko to indukuje dalej transkrypcję operonu *lux*, kodującego białka lucyferazy, związanego z luminescencją szczepów wskaźnikowych. W niniejszej pracy spośród przebadanych fitozwiązków, kwasy: ferulowy i chlorogenowy odznaczały się najwyższą zdolnością do hamowania syntezy

cząsteczek IAA u *Pseudomonas fluorescens* KM05. Przy stężeniu 0,02 µg/ml tych związków pożywce, emisja światła szczepów wskaźnikowych została obniżona o średnio 50% w 48h hodowli, i o średnio 65% w 72h hodowli w porównaniu z próbą kontrolną. Z kolei przy stężeniu 0,04 µg/ml fitozwiązków w pożywce, bioluminescencja *Vibrio harveyi* zredukowana została do poziomu 70% i 90%, co było widoczne w 48 i 72h trwania hodowli. Udział w pożywce powyższych fitozwiązków na poziomie 0,002 µg/ml nie wpłynął istotnie na zmianę zjawiska bioluminescencji u *Vibrio harveyi*. Również suplementacja pożywki wybranymi stężeniami kwasów: galusowego i *p*-kumarowego nie indukowała zmian w efektywności bioluminescencji *Vibrio harveyi*.

W niniejszej pracy, metodę kolorymetryczną, opracowaną przez Patten i Glick (1996), wykorzystano do oceny wpływu wybranych stężeń fitozwiązków do syntezy autoinduktorów IAA przez *Pseudomonas fluorescens* KM05. Otrzymane rezultaty okazały się być zbieżne z wynikami badań przesiewowych. W tych doświadczeniach potwierdzono potencjał kwasów: ferulowego i chlorogenowego, do hamowania syntezy cząsteczek IAA przez badane drobnoustroje. Powyższe zależności zaobserwowano dla dwóch stężeń tych fitozwiązków w pożywce, tj. 0,02 i 0,04 µg/ml. Ponownie udział w pożywce kwasu ferulowego i kwasu chlorogenowego na poziomie 0,002 µg/ml nie wpłynął istotnie na zmianę wydajności syntezy autoinduktorów IAA u *Pseudomonas fluorescens* KM05. W tych doświadczeniach zaobserwowano, że suplementacja pożywki kwasami: galusowym i *p*-kumarowym również nie indukowała zmian w efektywności syntezy cząsteczek IAA przez *Pseudomonas fluorescens* KM05.

Ważnym zadaniem badawczym w tej pracy była ocena transkryptomowa zmian w poziomie ekspresji genu *ttss* u *Pseudomonas fluorescens* KM05. Do realizacji tego celu pracy, wykorzystana została technika RT-qPCR. Nowością naukową tej pracy było wykazanie, że kwas ferulowy i kwas chlorogenowy, w stężeniach hamujących syntezę bakteryjnego IAA, jednocześnie powodują obniżenie ekspresji genu *ttss*, kodującego białko strukturalne aparatu TTSS u *Pseudomonas fluorescens* KM05. Co warto podkreślić, w hodowlach kontrolnych, prowadzonych na pożywkach suplementowanych syntetycznym autoinduktorem IAA, odnotowano zwiększoną ekspresję mRNA genu *ttss*.

Podsumowując, za główne osiągnięcie tego etapu pracy uważam:

- zaproponowanie metody bioluminescencyjnej, opracowanej przez Bassler i wsp. (1997) do badań przesiewowych, monitorujących wydajność syntezy cząsteczek sygnalizacyjnych IAA przez drobnoustroje;
 - wykazanie, że kwas ferulowy i kwas chlorogenowy, w stężeniach hamujących syntezę IAA, powoduje jednocześnie obniżenie poziomu ekspresji genu *ttss*, kodującego białko strukturalne aparatu TTSS u *Pseudomonas fluorescens*;
 - wskazanie potencjału aplikacyjnego kwasu ferulowego i kwasu chlorogenowego. Ekstrakty roślinne, bogate w te związki bioaktywne, w mogą zostać wykorzystane przy projektowaniu nowoczesnych preparatów do konserwowania żywności pochodzenia roślinnego (świeżej lub o minimalnym stopniu przetworzenia).
- Co istotne, zwłaszcza kwas ferulowy nie wykazuje działania alergizującego, jest łatwo absorbowany w drodze aktywnego transportu i wydalany z ustroju z moczem (Zhao i Moghadasian, 2008).

Udowodniona naukowo aktywność biologiczna olejków eterycznych z roślin, zachęciła do poszukiwań wśród nich materiałów, które mogą z równą skutecznością, co syntetyczne kwasy fenolowe, hamować syntezę bakteryjnego IAA i przez co wpływać na ekspresję genu *ttss* u *Pseudomonas fluorescens*. W badaniach wstępnych tej pracy takiej ocenie poddano szereg olejków eterycznych z roślin. Olejek eteryczny z białych i z czarnych ziaren pieprzu odznaczał się jednak najwyższym potencjałem hamującym syntezę autoinduktorów IAA. W ostatnim etapie pracy podjęto się próby oceny wpływu wyselekcjonowanych stężeń tych olejków na syntezę cząsteczek IAA i na poziom ekspresji genu *ttss* u *Pseudomonas fluorescens* KM06. Do weryfikacji założonych koncepcji, zastosowano hodowle *Pseudomonas fluorescens* KM06, prowadzone na pożywkach suplementowanych syntetycznym IAA. Ważnym etapem pracy były również badania modelowe *in situ*, oceniające rzeczywisty wpływ olejków eterycznych z ziaren pieprzu na wzrost *Pseudomonas fluorescens* KM06, biosyntezę autoinduktorów IAA oraz ekspresję w komórkach genu *ttss*. Te badania przeprowadzono w modelowym produkcie spożywczym. Rezultaty tych wieloetapowych doświadczeń przedstawiono w publikacji „***β-Caryophyllene-rich pepper essential oils suppress spoilage activity of Pseudomonas fluorescens* KM06 in fresh-cut lettuce**” (publikacja H6). Do realizacji poszczególnych zadań badawczych, wykorzystano zweryfikowane we wcześniejszych pracach (publikacja H3 - H5), procedury analityczne, z których większość to kompilacja metod konwencjonalnych z alternatywnymi i nowoczesnymi. Takie podejście badawcze, zagwarantowało wielopłaszczyznową analizę wpływu olejku eterycznego z ziaren pieprzu na ograniczenie zdolności *Pseudomonas fluorescens* KM06 do psucia modelowego produktu spożywczego.

Olejek eteryczny z białych i z czarnych ziaren pieprzu został pozyskany metodą hydrodestylacji w aparacie Derynga. Systemem GC-MS, dokonano następnie analizy składu chemicznego olejków eterycznych. W olejku eterycznym z czarnych ziaren pieprzu zidentyfikowano łącznie 20 związków, wśród których dominowały: β -kariofilen (23,31%), γ^3 -karen (20,38%) oraz limonen (16,12%). Na profil chemiczny olejku eterycznego z białych ziaren pieprzu składało się 18 związków, wśród których ponownie dominował: β -kariofilen (35,98%), γ^3 -karen (13,03%) oraz limonen (10,22%). W obu rodzajach olejków eterycznych, udział pozostałych związków, głównie monoterpenowych i seskwiterpenowych, nie przekraczał wartości 10%. Analiza składu chemicznego olejków eterycznych z ziaren pieprzu, zagwarantowała wstępną selekcję β -kariofilenu oraz limonenu do dalszych doświadczeń. Podstawą powyższej selekcji były prace, opublikowane przez Sikkema i wsp. (1994 i 1995) oraz Pichette i wsp. (2006). Sikkema i wsp. (1994) wykazali zdolność związków terpenowych do kumulacji w membranach komórkowych, czego konsekwencją jest między innymi zaburzenie płynności i wybiórczej przepuszczalności membrany. Pichette i wsp. (2006) oraz Sikkema i wsp. (1995) zaobserwowali brak aktywności γ^3 -karenu względem gram-ujemnych bakterii, za co może odpowiadać system aktywnego transportu efflux u *Pseudomonas* spp.. Biorąc pod uwagę testy *in vitro* Pichette i wsp. (2006), w których badacze stwierdzili jednakową aktywność biologiczną β -kariofilenu oraz limonenu względem gram-ujemnych bakterii, w pracy to β -kariofilen, został wytypowany jako główny czynnik zaburzający syntezę autoinduktorów IAA. Był to również związek dominujący w profilach chemicznych badanych olejków eterycznych.

W niniejszej pracy, do precyzyjnego wyznaczenia stężeń subinhibicyjnych olejków eterycznych i syntetycznego β -kariofilenu, zastosowano dwuetapowy schemat analityczny. Schemat ten złożony był z testu szeregowego, rekomendowanego przez Clinical and Laboratory Standards Institute, oraz metody barwienia komórek odczynnikiem Redox-SensorTM Green z jodkiem propidyny. Komórki bakteryjne, po barwieniu przyżyciowym, poddano następnie analizie techniką cytometrii przepływowej. W pracy, stężenia subinhibicyjne dla olejku eterycznego z czarnych oraz z białych ziaren pieprzu oraz ich głównego bioaktywnego związku, wyniosły odpowiednio: 5,0 μ l/ml, 3,1 μ l/ml oraz 2,8 μ l/ml. Powyższe stężenia nie wykazywały działania toksycznego na drobnoustroje, a udział subpopulacji komórek aktywnych metabolicznie przekraczał poziom 60% (dla hodowli suplementowanych olejkami eterycznymi z białych ziaren pieprzu i syntetycznym β -kariofilem) oraz 70% (dla prób suplementowanych olejkami eterycznymi z czarnych ziaren pieprzu). Wprowadzenie do hodowli *Pseudomonas fluorescens* KM06 syntetycznego autoinduktora IAA zwiększyło udział subpopulacji komórek aktywnych metabolicznie o 7%, w porównaniu z próbą kontrolną.

W pracy, efektywność syntezy autoinduktora IAA przez *Pseudomonas fluorescens* KM06, oceniona została metodą spektrofotometryczną z odczynnikiem Salkowskiego. Wyraźne zahamowanie syntezy cząsteczek sygnalizacyjnych IAA przez drobnoustroje, odnotowano w 72h eksperymentu. W tym doświadczeniu, syntetyczny β -kariofilen oraz olejek eteryczny z białych ziaren pieprzu w wyznaczonych stężeniach, zahamowały syntezę IAA u *Pseudomonas fluorescens* KM06 o ponad 90%. Obecność w pożywce olejku eterycznego z czarnych ziaren pieprzu na poziomie subinhibicyjnym, zredukowała wydajność syntezy bakteryjnych autoinduktorów IAA o 78%. W próbach pobranych z 24 i 48h inkubacji, zawartość autoinduktora IAA obniżona została o odpowiednio 50 i 55 %.

Wyniki uzyskane metodą spektrofotometryczną, skonfrontowano następnie z rezultatami badań nad zmianą poziomu ekspresji mRNA genu *ttss* u *Pseudomonas fluorescens* KM06. Ten etap badań, potwierdził, że bogate w β -kariofilen olejki eteryczne z ziaren pieprzu, hamując syntezę IAA, powodują jednoczesne obniżenie ekspresji genu *ttss* u *Pseudomonas fluorescens* KM06. Wyraźne zmiany w poziomie transkrypcji genu *ttss* odnotowano dla olejku eterycznego z białych ziaren pieprzu (-0,428) oraz syntetycznego β -kariofilenu (-0,448). Zmiany w poziomie transkrypcji genu *ttss* *Pseudomonas fluorescens* KM06, indukowane przez subinhibicyjne stężenia olejku eterycznego z czarnych ziaren pieprzu, wyniosły odpowiednio -0,106. Warto podkreślić, że dodatek do hodowli drobnoustrojów syntetycznego autoinduktora zagęszczenia IAA, spowodował wzrost poziomu mRNA genu *ttss* do wartości 1,219.

Ostatni etap tej pracy, poświęcono ocenie *in situ* wpływu olejków eterycznych z ziaren pieprzu na wzrost komórek, syntezę IAA, oraz transkryptomową analizę zmian w poziomie ekspresji genu *ttss* szczepu *Pseudomonas fluorescens* KM06. Szczep inokulowano do modelowego produktu spożywczego. Surowcem do przygotowania produktu, były świeże liście sałaty rzymskiej. Na obróbkę wstępną surowca składał się etap mycia wodą wodociągową o temperaturze 50°C przez 1min oraz sterylizacja liści sałaty promieniowaniem UV (30W) przez 30 min (po 15 min z każdej strony). Liście pocięto następnie na kawałki sterylnym nożem i ponownie poddano procesowi mycia w wodzie wodociągowej. Materiał podzielony na porcje, umieszczono na tackach polipropylenowych. Jakość mikrobiologiczną

przygotowanych prób oceniono według wytycznych, zawartych w dokumencie ISO 6887-1 (1999). Etap ten był niezbędny do wykluczenia negatywnego wpływu na wynik kolejnych analiz natywnych *Pseudomonas* spp. świeżej sałaty rzymskiej. Analiza mikrobiologiczna modelowego produktu, obejmowała dwa kierunki oznaczeń, tj. ogólną liczbę mikroorganizmów psychrofilnych/psychrotrofowych oraz liczbę *Pseudomonas* spp. Następnie zweryfikowane próby inokulowane były modelowym szczepem *Pseudomonas fluorescens* KM06, o wystandaryzowanej gęstości optycznej, według procedury opisanej przez Mahmoud (2010). Do modelowego produktu spożywczego wprowadzono następnie dressing, złożony oleju z pestek dyni, octu winnego oraz wyselekcjonowanych stężeń olejków eterycznych z białych i z czarnych ziaren pieprzu. Produkt zapakowano w torebki z folii o przepuszczalności tlenu $3000\text{cm}^3/\text{m}^2/24\text{h}$. Produkt przechowywano w temperaturze 4°C przez 72h. Monitoring zmian wzrostu *Pseudomonas fluorescens* KM06 w produkcie modelowym, przeprowadzono metodą płytkową Kocha. Zdolność syntezy IAA przez badane drobnoustroje oceniono metodą spektrofotometryczną z odczynnikiem Salkowskiego. Technika RT-qPCR zagwarantowała ocenę zmian poziomu ekspresji mRNA genu *ttss* *Pseudomonas fluorescens* KM06. W niniejszej pracy do wizualnej oceny jakościowej modelowego produktu, wykorzystano 5 stopniową skalę, w której 5 punktów przyznaje się próbom o świeżym wyglądzie bez oznak reakcji brązowienia enzymatycznego. 1 punkt przyznawany jest próbom o najniższej jakości, z postępującym procesem zmiany barwy liścia i z widoczną deformacją tkanki.

W przeprowadzonych doświadczeniach modelowych zaobserwowano, że dodatek do dresingu subinhibicyjnych stężeń olejków eterycznych z pieprzu, hamuje wzrost *Pseudomonas fluorescens* KM06. W porównaniu z próbą kontrolną, była to wartość niższa o 40% i 35% dla odpowiednio prób z olejkiem eterycznym z białych i z czarnych ziaren pieprzu. W doświadczeniach modelowych, potwierdzono również wpływ olejku eterycznego z ziaren pieprzu na hamowanie syntezy bakteryjnego autoinduktora IAA, i zależną od tego zjawiska ekspresję genu *ttss*. W próbach sałaty z dressingiem z olejkiem eterycznym z białych ziaren pieprzu, produkcja IAA bakteryjnego zredukowana została o 81%. W tym wariancie doświadczenia, poziom mRNA genu *ttss* *Pseudomonas fluorescens* KM06, obniżony został do wartości odpowiednio -0,880. Synteza IAA przez szczep *Pseudomonas fluorescens* KM06 w produkcie z dressingiem z olejkiem eterycznym z czarnych ziaren pieprzu, zredukowana została o 73% w porównaniu z próbą kontrolną. W tym eksperymencie stwierdzono również obniżenie poziomu ekspresji genu *ttss* drobnoustrojów (-0,680). Wyniki oceny sensorycznej, wskazały, że dodatek olejków eterycznych do dressingów do sałat, nie wpływa na wyraźne obniżenie jakości wizualnej produktu, w porównaniu z próbami kontrolnymi.

Podsumowując ten etap pracy, za najważniejsze osiągnięcie uważam:

- wykazanie, że bogate w β -kariofilen olejki eteryczne z ziaren pieprzu, w stężeniach subinhibicyjnych, hamują syntezę bakteryjnego IAA i powodują supresję genu *ttss* u fitopatogenów *Pseudomonas fluorescens*;
- zaprojektowanie i przeprowadzenie wieloaspektowego doświadczenia modelowego typu *challenge test*, obrazującego faktyczny wpływ olejków eterycznych z ziaren pieprzu na zahamowanie zdolności bakterii *Pseudomonas fluorescens* do psucia produktów spożywczych o minimalnym stopniu przetworzenia.

Podsumowując całościowo osiągnięcie, za najcenniejsze naukowo uważam następujące jego aspekty:

- wykorzystanie we wszystkich doświadczeniach szczepów natywnych, wyizolowanych z żywności i środowiska produkcyjnego i przeprowadzenie doświadczeń w układach, imitujących warunki przemysłowe lub w modelowych produktach spożywczych. Uważam, że dopiero takie podejście gwarantuje właściwe zrozumienie fizjologii drobnoustrojów, które stanowią realny problem dla przemysłu spożywczego;
- przeprowadzenie interdyscyplinarnych badań, potwierdzających, że mechanizm *quorum sensing* drobnoustrojów odgrywa istotną rolę w specyfice mikrobiologicznego psucia się żywności. Decyduje on również o tempie kolonizacji powierzchni użytkowych przez drobnoustroje;
- zaproponowanie nowych protokołów analitycznych, stanowiących kompilację metod konwencjonalnych z alternatywnymi i nowoczesnymi. Umożliwiły one precyzyjne wyznaczenie stężeń subinhibicyjnych testowanych środków przeciwdrobnoustrojowych, a także poznanie dynamiki syntezy bakteryjnych autoinduktorów AHL i IAA;
- wykazanie, że związki bioaktywne naturalnego pochodzenia, wpływając na syntezę bakteryjnych autoinduktorów *quorum sensing*, jednocześnie powodują supresję genów docelowych. Mogą one w ten sposób opóźniać proces zepsucia produktów spożywczych. Takie odkrycie może mieć zastosowanie przy projektowaniu nowoczesnych preparatów, przeznaczonych do konserwowania żywności czy preparatów przeznaczonych do mycia powierzchni abiotycznych. Ta nowa klasa środków, nie będzie działała na komórki typowo bójezo, lecz istotnie ograniczy ich aktywność metaboliczną. Takie postępowanie pozwoli wyeliminować ryzyko selekcji form opornych, stanowiące obecnie poważny problem w wielu dziedzinach życia.

Moje dalsze plany naukowe to kontynuacja zagadnień związanych z mechanizmem blokowania systemu *quorum sensing* u *Pseudomonas* spp. wyizolowanych z świeżych ryb. Obecnie jestem kierownikiem projektu badawczego pt.: „**Molekularna charakterystyka sposobu hamowania procesu *quorum sensing* przez wybrane olejki eteryczne u *Pseudomonas* spp. wyizolowanych z żywności**” (projekt badawczy NCN 2016/23/D/NZ9/00028). Projekt zakłada ocenę oddziaływania molekularnego wytypowanych olejków eterycznych oraz ich poszczególnych składników bioaktywnych na ekspresję genów kontrolowanych przez proces *quorum sensing* u dzikich szczepów. W projekcie zaplanowano sekwencjonowanie całego genomu trzech różnych gatunków drobnoustrojów, co pozwoli ocenić również ewolucyjne rearanżacje genetyczne, którym podlegają mikroorganizmy obecne w żywności i precyzyjnie zaprojektować startery do reakcji RT-qPCR (Większość badanych w projekcie drobnoustrojów jest nie opisana w literaturze przedmiotu). Oprócz analizy transkryptomowej, w projekcie zaplanowano badania *in silico* dokowania ligandów (cząsteczek autoinduktorów oraz bioaktywnych składników olejków eterycznych) do receptorów mechanizmu *quorum sensing* *Pseudomonas* spp. (LasR, RhlR i PqsR). Zaplanowano także wykonanie testów cytotoksyczności oraz genotoksyczności badanych olejków eterycznych w odniesieniu do komórek przewodu pokarmowego (z uwzględnieniem błony śluzowej żołądka, nabłonka jelitowego i wątroby). Wyniki otrzymane na tym etapie badań pozwolą ustalić czy wyznaczone we wcześniejszych doświadczeniach dawki olejków

eterycznych, wywołujące specyficzną odpowiedź biologiczną, są jednocześnie neutralne dla komórek przewodu pokarmowego. Zaplanowane w projekcie zadania badawcze umożliwią dalsze zweryfikowanie hipotezy naukowej: czy poprzez zaburzanie syntezy autoinduktorów mechanizmu *quorum sensing* można wpłynąć selekcyjnie na metabolizm drobnoustrojów? Jakie są molekularne mechanizmy tego procesu?

Literatura:

- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem. Toxicol.*, 46:446-475.
- Bassler B.L., Greenberg E.P., Stevens A.M. 1997. Cross-species induction of luminescence in the *quorum sensing* bacterium *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.*, 179:4043-4045.
- Blosser R.S., Gray K.M. 2000. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for *N*-acyl homoserine lactone autoinducers. *J. Microbiol. Meth.*, 40:47-55
- Cushnie T.P.T., Lamb A.J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 26:343-356
- El-Nagga E.A., El-Tawab Y.A. 2012. Compositional characteristics of date syrup extracted by different methods in some fermented dairy products. *Ann. Agric. Sci.*, 57:29-36.
- Horswill A.R., Stoodley P., Stewart P.S., Parsek M.R. 2007. The effect of the chemical, biological, and physical environment on *quorum sensing* in structured microbial communities. *Ann. Bioanal. Chem.*, 387:371-380
- Kumar L., Chhibber S., Kumar R., Kumar M., Harjai K. 2015. Zingerone silences *quorum sensing* and attenuates virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Fitoterapia*, 102:84-95
- Lee J.-H., Lee J. 2010. Indole as an intracellular signal in microbial communicates. *FEMS Microbiol. Rev.*, 34:426-444
- Lin Y.-H., Xu J.-L., Hu J., Wang L.-H., Ong S.L., Leadbetter J.R. 2003. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of *quorum quenching* enzymes. *Mol. Microbiol.*, 47:849-860
- Mahmoud B.S.M. 2010. Effects of x-ray radiation on *Escherichia coli* O157:H7 shredded iceberg lettuce. *Food Microbiol.*, 27:109-114
- Patten C., Glick B.R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.*, 42:207-220
- Pichette A., Larouche P.-L., Lebrun M., Legault J. 2006. Composition and antibacterial activity of *Abies balsamea* essential oil. *Phytother. Res.*, 20:371-373
- Sikkema J., de Bont J.A.M., Poolman B. 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.*, 269:8022-8028
- Sikkema J., de Bont J.A.M., Poolman B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.*, 59:201-222
- Suga H., Smith K.M. 2003. Molecular mechanisms of bacterial *quorum sensing* as a new drug target. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 7:586-591.
- Zhao Z.H., Moghadasian M.H. 2008. Chemistry, natural sources, dietary intake, and pharmacokinetic properties of ferulic acid: a review. *Food Chem.*, 109:691-702.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.A. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

W trakcie studiów magisterskich brałam aktywny udział w badaniach dotyczących zjawiska tworzenia się biofilmów *Bacillus megaterium* na powierzchniach abiotycznych (szkło, stal nierdzewna oraz teflon). Współuczestniczyłam w opracowaniu metod ekstrakcji i identyfikacji egzopolisacharydów bakteryjnych. W pracy analizowałam również wpływ zmian w syntezie egzopolisacharydów komórkowych na dynamikę tworzenia się błon biologicznych na testowanych powierzchniach stałych. Najważniejsze wyniki przeprowadzonych badań zostały przedstawione w mojej pracy magisterskiej pt. „*Biosynteza*

egzopolisacharydów i ich rola w adhezji *Bacillus megaterium* do powierzchni nieożywionych”. Zaprezentowałam je również podczas IX Sesji Sekcji Młodej Kadry Naukowej Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności. To wystąpienie ustne zostało wyróżnione i zostałam zaproszona przez Komitet Naukowy Konferencji do zgłoszenia publikacji z wyników pracy w czasopiśmie *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* (Zał. 4.II.A.1). W czasie realizacji powyższej tematyki badawczej współuczestniczyłam również w zbieraniu materiałów bibliograficznych, będących podstawą dwóch prac przeglądowych dotyczących między innymi charakterystyki zjawiska tworzenia się biofilmów bakteryjnych (publikacja w czasopiśmie *Biotechnologia*, Zał.4.II.D.3) oraz roli egzopolisacharydów mikrobiologicznych w technologii żywności (publikacja w czasopiśmie *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, Zał.4.II.A.6). W 2003 roku ukończyłam studia w gronie najlepszych absolwentów Wydziału Technologii Żywności Akademii Rolniczej w Poznaniu (obecnie Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu). Znalazłam się również wśród 5% najlepszych absolwentów Akademii Rolniczej w Poznaniu (obecnie Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu). Za powyższe osiągnięcia w 2003 roku otrzymałam nagrody, w tym *Medal za osiągnięcia w Studiach*, od JM Rektora AR w Poznaniu (obecnie UP w Poznaniu) prof. dr hab. Erwina Wąsowicza.

Bezpośrednio po ukończeniu studiów magisterskich, w 2003 roku, odbyłam miesięczną praktykę w Laboratorium Bakteriologicznym Poznańskiego Ośrodka Specjalistycznych Usług Medycznych w Poznaniu. W czasie trwania praktyki, zapoznałam się z podstawowymi technikami poboru materiału klinicznego do analiz mikrobiologicznych i szeroko rozumianą diagnostyką drobnoustrojów chorobotwórczych dla człowieka.

Od października 2003 roku, byłam słuchaczem czteroletniego Stacjonarnego Studium Doktoranckiego przy Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Bezpośrednio po rozpoczęciu studiów doktoranckich, dołączyłam do Zespołu, realizującego projekt naukowy „Adhezja bakterii z rodzaju *Bacillus* do powierzchni roboczych stosowanych w przemyśle spożywczym w zależności od warunków środowiskowych” (Projekt MNiSW, Zał.4.II.1.2). Projekt realizowano w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, a jego kierownikiem była dr inż. Katarzyna Czaczyk. W ramach projektu oceniano m. in. środowiskowe determinanty biosyntezy egzopolisacharydów u 9 szczepów modelowych *Bacillus* spp. W projekcie analizowano również między innymi wpływ dostępności składników pokarmowych w pożywce, pH pożywki oraz rolę temperatury hodowli na produkcję polisacharydów zewnątrzkomórkowych przez badane drobnoustroje. Doświadczenia w ramach projektu dotyczyły również oceny wpływu zmian w biosyntezie egzopolisacharydów na tempo kolonizacji testowanych powierzchni stałych przez *Bacillus* spp. Do realizacji tego zadania badawczego wykorzystano, technikę mikroskopii fluorescencyjnej, a interpretację wyników przeprowadzono przy użyciu 9-stopniowej skali adhezji. Było to zupełnie nowe naukowo podejście analityczne, pozwalające obserwować przede wszystkim zmiany w architekturze biofilmów bakteryjnych w zależności od fizjologii komórek. Wyniki części badań z projektu zostały opublikowane między innymi na łamach czasopism *Polish Journal of Microbiology* (Zał.4.II.A.4) oraz *Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis, Scientia Alimentaria* (Zał.4.II.D.1). Rezultaty badań prezentowane były również na sympozjach międzynarodowych i krajowych. Wystąpienie podczas XXXVI Sesji Naukowej

Komitetu Nauk o Żywności PAN zostało wyróżnione przez Komitet Naukowy Konferencji. Podczas realizacji projektu badawczego, zebrano również materiały bibliograficzne, będące podstawą dwóch prac przeglądowych dotyczących mechanizmów oporności biofilmów bakteryjnych na czynniki przeciwdrobnoustrojowe (publikacja w czasopiśmie *Biotechnologia*, Zał.4.II.D.4) oraz środowiskowych determinantów biosyntezy zewnątrzkomórkowych substancji (EPS, ang. extracellular polymeric substances) i ich funkcji w procesie tworzenia się biofilmów (publikacja w czasopiśmie *Polish Journal of Environmental Studies*, Zał.4.II.A.8).

W latach 2007-2009 współuczestniczyłam w realizacji projektu badawczego „Identyfikacja czynników morfologicznych i fizjologicznych warunkujących tworzenie się biofilmów bakteryjnych na powierzchniach abiotycznych w warunkach ograniczonej dostępności składników odżywczych” (Projekt finansowany przez MNiSW, Zał.4.II.I.3). Projekt realizowano w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, a jego kierownikiem była dr hab. inż. Katarzyna Czaczyk. W ramach tego projektu, tematyka badawcza, która wzbudziła moje szczególne zainteresowanie i stała się podstawą mojej rozprawy doktorskiej, dotyczyła wpływu warunków głodowych środowiska na zmiany morfologiczne i wybrane cechy fizjologiczne komórek, które decydują o adhezji drobnoustrojów do powierzchni abiotycznych. Swoją pracę doktorską pt. „Identyfikacja czynników morfologicznych i fizjologicznych odpowiedzialnych za intensyfikację zjawiska adhezji mikroorganizmów w warunkach głodowych”, obroniłam w 2008 roku. Doświadczenia do pracy doktorskiej prowadzono w układach modelowych, a przedmiotem badań były drobnoustroje drugiej klasy ryzyka (tj. *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgarius*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, oraz *Enterococcus faecalis*). Zadania badawcze, zaplanowane w ramach pracy doktorskiej, zdecydowanie wykraczały poza kanon klasycznych metod mikrobiologicznych i wymagały użycia różnych technik analitycznych (w tym, cyfrowej analizy obrazu mikroskopowego, wykorzystania złożonych procedur izolacji zewnątrzkomórkowych białek i ich identyfikacji, wykonania analiz chromatograficznych, które wykorzystano następnie w identyfikacji egzopolisacharydów bakteryjnych). Efektem pracy doktorskiej były publikacje w czasopismach: *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Zał.4.II.A.3), *Current Microbiology* (Zał.4.II.A.9), *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* (Zał.4.II.A.2), *Aparatura Naukowa i Dydaktyczna* (Zał.4.II.D.2).

Zespół realizujący wspomniany wyżej projekt badawczy, zebrał również materiały bibliograficzne, będące podstawą trzech prac przeglądowych, które charakteryzowały między innymi wpływ warunków głodowych środowiska na metabolizm drobnoustrojów (publikacja w czasopiśmie *Postępy Mikrobiologii*, Zał.4.II.A.7), metody usuwania biofilmów bakteryjnych z powierzchni stałych (publikacja w czasopiśmie *Przemysł Spożywczy*, Zał.4.II.D.5), oraz charakteryzowały zdolności adhezyjne *Proteus vulgaris* – mikroorganizmu niepożądanego w żywności (publikacja w czasopiśmie *Przemysł Spożywczy*, Zał.4.II.D.6). Rezultaty badań wykonanych w ramach projektu prezentowane były również na sympozjach międzynarodowych oraz krajowych. Wystąpienie podczas XXVI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów „Drobnoustroje – wyzwania i nadzieje” zostało wyróżnione przez Komitet Naukowy Konferencji w sesji tematycznej, poświęconej biofilmom bakteryjnym.

5.B. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora, oprócz prac koncentrujących się wokół zjawiska *quorum sensing* *Pseudomonas fluorescens*, uczestniczyłam jako główny wykonawca lub wykonawca łącznie w pięciu projektach badawczych, które finansowane były zarówno z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, jak i przez MNiSW oraz NCN. Byłam również koordynatorem i głównym wykonawcą dwóch tematów zamawianych przez przedsiębiorstwa: Biomedica Poland Sp. z o.o. w Piasecznie oraz Amica S.A. we Wronkach.

Moja działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora mieściła się w następujących obszarach tematycznych:

1. Charakterystyka zjawiska tworzenia się biofilmów bakteryjnych na materiałach technicznych;
2. Ocena jakości i bezpieczeństwa mikrobiologicznego nowych produktów spożywczych, w tym żywności bioaktywnej o zaprogramowanych właściwościach prozdrowotnych;
3. Izolacja i charakterystyka fizjologiczna szczepów środowiskowych, zdolnych do konwersji glicerolu do 1,3-propandiolu;
4. Izolacja i identyfikacja mikroflory jelitowej człowieka;
5. Charakterystyka mikroflory zdolnej do wytwarzania związków zapachowych.

Charakterystyka zjawiska tworzenia się biofilmów bakteryjnych na materiałach technicznych

Po uzyskaniu stopnia doktora, badania dotyczące zjawiska tworzenia się biofilmów bakteryjnych na powierzchniach abiotycznych zajmowały nadal czołowe miejsce w mojej działalności naukowej. W ramach tego obszaru tematycznego, podjęłam współpracę z Zespołem Zakładu Technologii Chemicznej, Instytutu Technologii i Inżynierii Chemicznej, Politechniki Poznańskiej. Zespół z Politechniki Poznańskiej, pod kierownictwem prof. dr hab. inż. Teofila Jesionowskiego, zajmował się otrzymywaniem nowej generacji funkcjonalnych tlenków nieorganicznych na bazie SiO₂ według alternatywnych metod precypitacji emulsyjnej czy metodą zol-żel. Podjęta tematyka badawcza pozwoliła Zespołowi uzyskać materiały o unikatowych właściwościach fizykochemicznych, dyspersyjnych i morfologiczno-strukturalnych, jak i użytkowych. Mój udział w pracach Zespołu polegał na ocenie przeciwdrobnoustrojowej tlenków nieorganicznych metodami konwencjonalnymi, łącznie z wyznaczeniem indeksów MIC i MBC oraz badaniu właściwości przeciw-adhezyjnych uzyskanych materiałów. Nowatorska forma materiału badawczego, skłoniła mnie do współpracowania na potrzeby tego projektu, między innymi nowej procedury barwienia prób i sposobu ich obserwacji pod mikroskopem fluorescencyjnym. Wyniki badań w ramach tej współpracy zostały opublikowane w czasopismach: *Bioelectrochemistry* (Zał. 4.II.A.12) oraz *Open Chemistry* (*The Central European Journal of Chemistry*; Zał. 4.II.A.16).

Szczególnie ważnym dla mnie aspektem w ramach tego obszaru tematycznego, było podjęcie współpracy z Instytutem Consiglio Nazionale delle Ricerche, ISMAR – Istituto di Scienze Marine we Włoszech (Zał. 5.F.1). Ta międzynarodowa współpraca obejmowała testowanie w warunkach *in vivo* aparatury przeznaczonej do monitoringu zjawiska tworzenia

się biofilmów bakteryjnych na materiałach technicznych. Na potrzeby tego projektu, Zespół Inżynierów Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, zaprojektował unikatowe dwa układy doświadczalne, imitujące między innymi przemysłowe systemy dystrybucji wody. Układy dostosowane były do potrzeb aparatu skonstruowanego przez Partnerów z Włoch. W przygotowanych układach doświadczalnych, analizowałam wpływ parametrów fizycznych hodowli na fizjologię wzrostu komórek i architekturę biofilmów. Byłam również osobą odpowiedzialną za projektowanie warunków prowadzenia hodowli, prowadzenie samych hodowli, dobór szczepów do doświadczeń, oraz przygotowanie końcowego raportu merytorycznego. Wyniki tych doświadczeń będą publikowane w pracach, które w chwili obecnej są na etapie opracowania redakcyjnego.

Precyzyjna analiza zjawiska tworzenia się biofilmów bakteryjnych wymaga interdyscyplinarnych badań, połączonych ze sobą w jeden spójny protokół analityczny. Stąd w ostatnich latach mojej pracy, rozpoczęłam współpracę z dr inż. Wojciechem Juzwą z Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, mającą na celu opracowanie nowego protokołu analitycznego, przeznaczonego do badań zjawiska adhezji drobnoustrojów. Protokół ten obejmuje oznaczenia konwencjonalne metodą płytkową Kocha, obserwacje prób pod mikroskopem fluorescencyjnym/skaningowym mikroskopem elektronowym, oraz przede wszystkim oznaczenia z wykorzystaniem cytometru przepływowego sprzężonego z sorterem komórek. Projektowany protokół umożliwił nam między innymi wieloparametryczną ocenę stopnia wrażliwości komórek w biofilmie na działanie środków dezynfekcyjnych oraz wytypowanie subpopulacji komórek w biofilmie o obniżonym potencjale metabolicznym i będących w stanie anabiozy (a więc frakcji biofilmu, których nie można badać konwencjonalnymi testami). Uważam, że jest to innowacyjne podejście badawcze, które może w przyszłości zastąpić lub uzupełnić konwencjonalne procedury ustalania stężeń bójczych biocydów względem mikroorganizmów niepożądanych w przemyśle spożywczym. Moja aktywność badawcza w ramach tej współpracy skupiła się na wyborze szczepów do doświadczeń, prowadzeniu hodowli mikroorganizmów, przeprowadzeniu oznaczeń metodą płytkową Kocha oraz przygotowaniu prób do obserwacji pod mikroskopem fluorescencyjnym. Pierwsze rezultaty tych doświadczeń zostały dwukrotnie opublikowane w czasopiśmie *Biofouling* (Zał.4.II.A.17,21).

Ocena jakości i bezpieczeństwa mikrobiologicznego nowych produktów spożywczych, w tym żywności bioaktywnej o zaprogramowanych właściwościach prozdrowotnych

Bardzo cennych umiejętności w aspekcie diagnostyki mikrobiologicznej żywności, nabyłam współuczestnicząc jako wykonawca w realizacji projektu badawczego pt. „*Nowa żywność bioaktywna o zaprogramowanych właściwościach prozdrowotnych*”. Projekt był finansowany z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (PO IG 01.01.02-00-061/09). Pracę swoją realizowałam w ramach zadania badawczego 9.2. Zadanie poświęcone było ocenie bezpieczeństwa frakcji i gotowych produktów: ocenie toksykologicznej, mikrobiologicznej, właściwościom mutagennym, genotoksycznym, cytotoksycznym i alergizującym. Moja praca w ramach tego projektu sprowadzała się do kompleksowej oceny jakości mikrobiologicznej i poziomu bezpieczeństwa mikrobiologicznego. Przedmiotem tej pracy były surowce

i gotowe produkty spożywcze na różnych etapach ich przechowywania. W projekcie odpowiadałam, za planowanie i prawidłowy przebieg mikrobiologicznych eksperymentów, wyznaczenie kierunków oznaczeń mikrobiologicznych w zależności od specyfiki i przeznaczenia produktów, przygotowanie materiałów do badań mikrobiologicznych, wykonywanie posiewów, identyfikację szczepów, oraz przygotowanie raportów z przebiegu tych doświadczeń. Aby podwyższyć swoje umiejętności z zakresu mikrobiologii żywności, przed przystąpieniem do realizacji tego projektu badawczego, w 2012 roku odbyłam miesięczny staż zawodowy w akredytowanej pracowni mikrobiologicznej Laboratorium Usługowo-Badawczego „Biochemik” w Śmiłowie koło Piły.

Nabyte wcześniej umiejętności w zakresie diagnostyki mikrobiologicznej produktów spożywczych, wykorzystałam również we współpracy z Zespołem z Instytutu Żywności Pochodzenia Roślinnego, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu oraz Instytutu Technologii Mięsa, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Nasza współpraca dotyczyła identyfikacji drobnoustrojów odpowiedzialnych za psucie się wyrobów mięsnych. Do tego celu wykorzystane zostały konwencjonalne metody mikrobiologiczne oraz nowoczesne techniki genetyczne. Ważnym aspektem powyższej współpracy było wytypowanie filotypów wspólnych oraz filotypów specyficznych (endemicznych) w produktach pochodzenia zwierzęcego, które odpowiadają za mikrobiologiczne psucie się żywności i których nie można zdiagnozować w konwencjonalny sposób. W powyższym projekcie odpowiadałam za wyznaczenie kierunków oznaczeń mikrobiologicznych, przygotowanie materiałów do badań mikrobiologicznych, wykonywanie posiewów oraz ich interpretację. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń opublikowane zostały na łamach czasopisma *Journal of the Science of Food and Agriculture* (Zał. 4.II.A.22).

Izolacja i charakterystyka fizjologiczna szczepów środowiskowych, zdolnych do konwersji glicerolu do 1,3-propandiolu (1,3-PD)

Kolejnym ważnym nurtem w mojej działalności naukowo-badawczej było uczestniczenie w charakterze wykonawcy w realizacji projektu badawczego pt. „*Biotechnologiczna konwersja glicerolu do polioli i kwasów dikarboksylowych*”. Projekt był finansowany z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (PO IG 01.01.02-00-061/09). Moja aktywność w tym projekcie koncentrowała się nie tylko, na współuczestniczeniu w realizacji zadania 1.3 pt. *Izolacja i skryning mikroorganizmów zdolnych do biosyntezy 1,3-PD z glicerolu*. Włączyłam się również w prace Zespołu Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, których zadaniem było przygotowanie i edytowanie studium wykonalności projektu. Efektem kilkuletniej pracy badawczej w projekcie było: (i) opracowanie procedury izolacji mikroflory bezwzględnie beztlenowej i mikroaerofilnej z środowiska naturalnego, która wykazuje zdolność syntezy 1,3-PD z glicerolu; (ii) opracowanie procedur hodowli i zabezpieczania wyselekcjonowanych beztlenowych kultur bakteryjnych w warunkach laboratoryjnych; (iii) porównanie składu podłoży izolacyjnych/produkcyjnych na efektywność selekcji z środowiska naturalnego bakterii z rodzaju *Clostridium* spp.; (iv) zmodyfikowanie podłoży mikrobiologicznych, w celu zwiększenia wydajności izolacji i selekcji nieopisanych dotąd w literaturze gatunków bakterii *Clostridium* spp. z środowiska naturalnego, które są zdolne do syntezy 1,3-PD; oraz (v)

charakterystyka fizjologiczna uzyskanych szczepów *Clostridium* spp. Uczestnicząc w realizacji tego projektu, wyizolowałam ponad 3000 szczepów, z których 40 odznaczało się wysoką wydajnością do konwersji glicerolu do 1,3-PD. Kolekcja tych szczepów została zdeponowana w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Za szczególne osiągnięcie tego etapu działalności naukowej uważam opracowanie procedury izolacji mikroaerofilnych gatunków: *Clostridium bifermentans*, *Clostridium sordelli* oraz *Streptomyces* spp. z środowiska naturalnego. Szczepy wyselekcjonowałam z gleby i osadów dennych. Gatunki te, w odróżnieniu od wielu przedstawicieli *Clostridium* spp. oraz *Streptomyces* spp., odznaczają się odpornością na wysokie stężenia glicerolu i NaCl w pożywce i są aktywne metabolicznie w szerokim spektrum temperatury i przy zawartości tlenu na poziomie około 5%. Rezultaty tych badań opublikowane zostały między innymi w czasopismach *Journal of Bioscience and Bioengineering* (Zał.4.II.A.11) oraz *Acta Biochimica Polonica* (Zał.4.II.A.14). Rezultaty badań prezentowane były również na sympozjach międzynarodowych i krajowych (Zał.4.J; Zał.6B.14,18,21,25). Wystąpienie podczas IV Congress of Polish Biotechnology and IV EUROBIOTECH 2011 zostało wyróżnione. Efektem tego było zaproszenie przez redakcję czasopisma *Process Biochemistry* do napisania publikacji przeglądowej, dotyczącej fizjologicznych predyspozycji szczepów z rodzaju *Clostridium* do syntezy 1,3-PD (Zał.4.II.A.25). W czasie realizacji powyższej tematyki badawczej współuczestniczyłam również w przygotowaniu pracy przeglądowej dotyczącej przemysłowego wykorzystania bakterii z rodzaju *Clostridium* (publikacja w czasopiśmie *Postępy Mikrobiologii*, Zał.4.II.A.26).

Izolacja i identyfikacja mikroflory jelitowej człowieka

W latach 2010-2013 uczestniczyłam również jako główny wykonawca w projekcie naukowym pt. „Wykorzystanie antocjanów z owoców aronii, czarnej porzeczki i czarnego bzu oraz korzeni czarnej marchwi w chemoprewencji nowotworu jelita grubego” (Zał.4.I.5). Projekt był finansowany przez MNiSW, a jego kierownikiem była dr inż. Anna Olejnik. Założeniem projektu było zgłębienie wiedzy na temat zmian bioaktywności ekstraktów z wybranych owoców, zachodzących podczas pasażu przez przewód pokarmowy, oraz pozyskanie danych, które mogłyby być podstawą do podjęcia dalszych badań *in vivo* nad ich wykorzystaniem w chemoprewencji nowotworów jelita grubego. W projekcie analizowano wpływ ekstraktów na zjawiska związane z inicjacją procesu kancerogenezy oraz zdolność do ingerowania w kolejne etapy rozwoju nowotworu, zlokalizowanego w jelicie grubym. Oceniano właściwości przeciwmutagenne, przeciwzapalne i przeciwoksydacyjne ekstraktów, ich potencjał cytotoksyczny, antyproliferacyjny i proapoptyczny w odniesieniu do komórek nowotworowych. Badania do projektu realizowano przy zastosowaniu metod *in vitro*. W projekcie wykorzystano proces trawienia ekstraktów w sztucznym przewodzie pokarmowym *in vitro*, co pozwoliło zbliżyć warunki modelowe do środowiska naturalnie występującego w organizmie. Moja praca w projekcie polegała na wyselekcjonowaniu i wstępnej identyfikacji mikroflory jelitowej człowieka, zdolnej do wzrostu w warunkach laboratoryjnych. Na potrzeby projektu, przygotowałam kolekcję modelowych kultur bakteryjnych złożonych głównie z przedstawicieli rodziny *Enterobacteriaceae*, oraz *Lactobacillus* spp. i *Clostridium* spp.. Drobnoustroje wyodrębniłam z różnych materiałów

klinicznych. Opracowałam nową procedurę selekcji tych bezwzględnie beztlenowych i względnie beztlenowych szczepów. Opracowałam również procedury ich utrzymywania w laboratorium, z wykorzystaniem modyfikowanych pożywek mikrobiologicznych. Praca z materiałem klinicznym, mogącym zawierać szczepy chorobotwórcze dla człowieka, nałożyła na mnie również obowiązek zorganizowania odpowiedniego miejsca w laboratorium do bezpiecznej pracy tym materiałem. Rezultaty badań tego projektu opublikowane zostały między innymi w czasopismach: *Journal of the Science of Food and Agriculture* (Zał.4.II.A.15), *Food Chemistry* (Zał.4.II.A.20) oraz *Journal of Functional Foods* (Zał.4.II.A.18).

Charakterystyka fizjologiczna mikroflory zdolnej do wytwarzania związków zapachowych

Szczególnie ważnym etapem mojej działalności naukowo-badawczej po uzyskaniu stopnia doktora było włączenie się w prace Zespołu z Zakładu Chemii Żywności i Analizy Instrumentalnej, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Byłam głównym wykonawcą projektu pt. „*Drogi powstawania związków zapachowych w polskich regionalnych produktach mleczarskich wytwarzanych według tradycyjnej technologii. Wpływ mikroflory oraz sposobu otrzymywania*” (Zał.4.II.1.7). Projekt był finansowany przez NCN, a jego kierownikiem była dr inż. Małgorzata Majcher. W ramach projektu Zespół z Zakładu Chemii Żywności i Analizy Instrumentalnej, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu podjął się próby zidentyfikowania kluczowych związków zapachowych, kształtujących aromat czterech tradycyjnie otrzymywanych produktów mleczarskich: wielkopolskiego sera smażonego, sera suszonego podlaskiego, sera Lazur, oraz naturalnie ukwaszonej maślanki. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów pozwoliły na rozkodowanie aromatu badanych produktów mleczarskich. Dzięki uzyskanej wiedzy, wśród setek związków lotnych występujących w badanych produktach, Zespół wyodrębnił kilkanaście tak zwanych aktywnych zapachowo, które wchodząc w reakcje z receptorami aktywują je dając odczucie zapachu. Przeprowadzone równolegle oznaczenia mikrobiologiczne wykazały istotny wpływ dominującej mikroflory w kształtowaniu zapachu produktów finalnych. W powyższym projekcie powierzono mi za zadanie zaplanowanie i przeprowadzenie kompleksowej analizy mikrobiologicznej surowców i produktów gotowych. Moim zadaniem w projekcie była również izolacja i identyfikacja szczepów dominujących w ocenianych próbach. Podjęłam się również stworzenia kolekcji kultur drobnoustrojów, głównie *Lactobacillus* spp. i *Lactococcus* spp., oraz unikatowej kolekcji grzybów pleśniowych. Wszystkie szczepy wyizolowałam z produktów spożywczych, badanych w ramach projektu. Szczególnie ważnym osiągnięciem tego projektu było wyizolowanie ponad 40 szczepów grzybów pleśniowych *Galactomyces geotrichum*. Izolaty pozyskano, zarówno z półproduktów, jak i z środowiska produkcyjnego zakładu przemysłowego. Najcenniejszym w aspekcie przemysłowym, okazał się szczep *Galactomyces geotrichum* MK017, który odznaczał się zdolnością do biosyntezy związków zapachowych, takich jak: 2-feniloetanol, aldehyd fenylooctowy czy kwas fenylooctowy. Właściwości metaboliczne tego drobnoustroju, zostały potwierdzone za pomocą modelowych doświadczeń prowadzonych w bioreaktorze z wykorzystaniem zmodyfikowanych pożywek mikrobiologicznych, suplementowanych izotopowo znakowanymi prekursorami takimi jak [$^2\text{H}_5$]-L-feniloalanina. Szczep *Galactomyces geotrichum* został scharakteryzowany, zarówno

pod względem morfologicznym, jak i fizjologicznym. Do tego celu wykorzystano między innymi macierz fenotypową systemu BIOLOG. Uczestniczyłam również w przygotowaniach szczepu do depozytu do celów postępowania patentowego. Szczep został zdeponowany w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych, Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie pod numerem KKP 2049p. Rezultaty badań projektu opublikowane zostały między innymi w czasopismach: *International Dairy Journal* (Załącznik 4.II.A.13), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Załącznik 4.II.A.24), *Nauka. Przyroda. Technologie* (Załącznik 4.II.D.11) oraz *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* (Załącznik 5.II.A.19). Rezultaty z projektu prezentowane były również na licznych konferencjach krajowych i międzynarodowych. Poster zaprezentowany na sympozjum 10th Wartburg Symposium on Flavor Chemistry & Biology 2013 w Niemczech został wyróżniony przez Komitet Naukowy (Załącznik 4.J).

Obecnie współuczestniczę również w badaniach oceniających potencjał grzybów pleśniowych *Galactomyces geotrichum* do syntezy związków bioaktywnych, ze szczególnym uwzględnieniem polienowych kwasów tłuszczowych. Badania te prowadzone są przez Zespół z Zakładu Chemii Żywności i Analizy Instrumentalnej, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Powyższa tematyka badawcza jest podstawą pracy doktorskiej mgr inż. Anny Grygier, przy której decyzją Rady Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z 2016 roku, pełnię funkcję promotora pomocniczego. Promotorem pracy jest dr hab. inż. Magdalena Rudzińska prof. nadzw. z Zakładu Chemii Żywności i Analizy Instrumentalnej, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Pani mgr inż. Anna Grygier jest obecnie słuchaczem czwartego roku Stacjonarnego Studium Doktoranckiego przy Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Po uzyskaniu stopnia doktora, byłam również koordynatorem i głównym wykonawcą dwóch tematów zamawianych z przemysłu. Z partnerem Biomedica Poland Sp. zo.o. w Piasecznie współpracowałam w zakresie opracowania innowacyjnego testu analitycznego, przeznaczonego do szybkiej detekcji chorobotwórczych *Salmonella* sp. w próbach paszy. Z przedsiębiorstwem Amica S.A. we Wronkach, współpracowałam w zakresie mikrobiologicznej oceny poprawy skuteczności mycia i sterylizacji powierzchni wewnętrznych nowych prototypów urządzeń AGD i umytych w nich naczyń kuchennych.

6. Wskaźnik dokonań naukowych

- Suma punktów za publikacje, według komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 9 grudnia 2016 roku: **955**
- Sumaryczny *impact factor* publikacji naukowych zgodnie z rokiem opublikowania: **54,254**
- Indeks Hirscha obliczona na podstawie bazy Web of Science (bez autocytowań): **6**
- Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science z pominięciem autocytowań: **175**

Zestawienie dorobku naukowego z podziałem na poszczególne formy aktywności, przedstawiłam w tabeli 1.

Tabela 1 Zestawienie dorobku naukowego

	Ilość	IF	Punkty MNiSW ₂₀₁₆
<i>Dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora</i>			
Prace oryginalne z listy Journal Citation Reports (JCR)	5	1,215	74
Prace oryginalne spoza listy JCR, uwzględnione w wykazie MNiSW	2	-	23
Prace przeglądowe z listy Journal Citation Reports (JCR)	3	0,817	43
Prace przeglądowe spoza listy JCR, uwzględnione w wykazie MNiSW	4	-	50
Rozdziały w książkach	-	-	-
Zgłoszenia patentowe	-	-	-
Referaty na konferencjach	1	-	-
Komunikaty na konferencjach międzynarodowych i krajowych	2 6	- -	- -
<i>Podsumowanie dorobku naukowego przed uzyskaniem stopnia doktora</i>	23	2,032	190
<i>Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora</i>			
Prace oryginalne z listy Journal Citation Reports (JCR)	20	47,90	593
Prace oryginalne spoza listy JCR, uwzględnione w wykazie MNiSW	5	-	42
Prace przeglądowe z listy Journal Citation Reports (JCR)	4	4,322	75
Prace przeglądowe spoza listy JCR, uwzględnione w wykazie MNiSW	4	-	55
Rozdziały w książkach	2	-	-
Zgłoszenia patentowe	1	-	-
Referaty na konferencjach	3	-	-
Komunikaty na konferencjach międzynarodowych i krajowych	19 11	- -	- -
<i>Podsumowanie dorobku naukowego po uzyskaniu stopnia doktora</i>	69	52,222	775
Ogółem	92	54,254	955

Kamila Mysz