



Prof. dr hab. Anita Rywińska
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
ul. Chelmońskiego 37
51-630 Wrocław

Wrocław, 17.09.2023 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalii Małgorzaty Tomasz pt. „Wpływ wybranych olejków eterycznych na metabolizm zależny od systemu quorum sensing u *Pseudomonas psychrophila* KM02 wyizolowanych z żywności” wykonanej w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, pod kierunkiem prof. UPP dr hab. inż. Kamili Myszk.

Dobór i znaczenie tematu

W skali całego świata obserwuje się ciągły wzrost produkcji ryb, na co wpływ ma przede wszystkim ich wysoka wartość odżywcza oraz dostępność, dzięki której jest to produkt stosunkowo tani. Niemniej stała kontrola zasobów gatunków podstawowych dla rybołówstwa wskazuje na ciągłe uszczuplanie zasobów rybnych. To zjawisko niestety generuje zmiany w wielkości dopuszczalnych połowów, a z drugiej strony dane ekonomiczne wskazują, na ogromne straty już złowionych ryb z powodu ich zepsucia. Praktyczny aspekt niniejszej rozprawy to znalezienie rozwiązania dla tego niekorzystnego zjawiska. Za pogarszanie jakości produktów rybnych odpowiedzialne są głównie psychotrofowe gatunki bakterii *Pseudomonas* spp., a ich aktywność metaboliczna jest regulowana przez system quorum sensing (QS). Znalezienie czynników ingerujących w ten system stanowi istotne naukowo zagadnienie i stwarza możliwości opracowania nowych rozwiązań zmierzających do ograniczenia aktywności metabolicznej tych drobnoustrojów. Zakres prac ujętych w niniejszej rozprawie świetnie wpisuje się w to zagadnienie. Tytuł pracy odzwierciedla zakres pracy, niemniej nie wiele różni się od głównego celu badań.



Charakterystyka formalnej strony pracy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Natalii Małgorzaty Tomasz jest oparta na zestawie czterech spójnych tematycznie artykułów naukowych (trzech oryginalnych artykułów eksperymentalnych i jednej pracy przeglądowej) opublikowanych w latach 2020-2022 kolejno w czasopismach Applied Sciences, International Journal of Food Microbiology, Food Control oraz Scientific Reports. Publikacje liczą od dwóch do siedmiu autorów ale doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich czterech pracach, a jej indywidualny wkład w ich powstanie wynosił od 55 do 65%, co potwierdzają oświadczenia współautorów, w których bardzo szczegółowo wykazano zakres przeprowadzonych prac. Artykuły zostały poddane wnikliwej analizie i ocenie przez redakcję czasopism oraz niezależnych recenzentów, a fakt ich opublikowania wskazuje na ich wysoką wartość naukową. Sumaryczny współczynnik IF publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej jest wysoki i wynosi 17,883, a liczba punktów ministerialnych zgodnie z rokiem opublikowania 480.

Rozprawa doktorska skonstruowana jest zgodnie z nowoprzyjętym systemem, gdzie wspomniane publikacje stanowią jej zasadniczą część i zostały dołączone na końcu opracowania. Niemniej manuskrypt liczący 101 stron wygląda jak klasyczna rozprawa doktorska, zawiera spis publikacji wchodzących w skład rozprawy, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, krótki wstęp, hipotezy i cele badawcze, dość obszerny rozdział opisujący materiały i metody jako część doświadczenia, omówienie wyników wraz z dyskusją, podsumowanie, wnioski oraz bibliografia, spis rycin i tabel.

Cytowania pozycji bibliograficznych, jak i własnych dokumentów w tekście są prawidłowe. Dokumentacja uzyskanych wyników obejmuje 10 tabel i 23 rysunki. W moim odczuciu nie wszystkie rysunki są dobrze opisane, dotyczy to zwłaszcza osi, ponadto rysunki zawierają dużo nie objaśnionych skrótów, np. rys. 6, 9, 17, 18 i inne, co trochę utrudniało ich odczyt.

Reasumując strukturę rozprawy, stwierdzam, że konstrukcja pracy jest klarowna i logiczna, a dokumentacja kompletna. Pragnę podkreślić, iż przyjęta konwencja przygotowania rozprawy, uwzględniająca artykuł przeglądowy wprowadzający w temat oraz wyniki zamieszczone w kolejnych publikacjach jest w mojej opinii jak najbardziej prawidłowa i zasadna. Zapoznanie się z rzeczonymi artykułami naukowymi, jak również z załączonymi oświadczeniami współautorów publikacji, pozwala stwierdzić, że wkład Doktorantki w przeprowadzenie badań prezentowanych w rozprawie jest kluczowy i wiodący. Tym samym, można uznać przedstawioną rozprawę doktorską za autorskie dzieło mgr inż. Natalii Małgorzaty Tomasz.



Ocena merytoryczna pracy

W krótkim, liczącym 5 stron wstępie manuskryptu, Autorka koncentruje się na uzasadnieniu podjętych w kierunku rozpoznania zjawiska QS badań w kontekście poszukiwania skutecznych strategii zapobiegania przedwczesnemu psuciu się produktów rybnych. W tej części przedstawiono dość zatrważające dane statystyczne, które podają, iż 30% złowionych ryb ulega utracie wskutek zepsucia, pomimo wdrażania coraz to nowych programów kontroli w przemyśle spożywczym. Dane te jednak pochodzą sprzed 13 lat, a jak wygląda ta sytuacja obecnie?

Dalej opisane zostało zjawisko QS jako proces porozumiewania się komórek bakterii polegający na syntezie i wydzielaniu do otoczenia cząsteczek sygnałowych zwanych autoinduktorami, które uczestniczą w regulacji różnych procesów fizjologicznych, takich jak proteoliza, lipoliza czy tworzenie biofilmu. Zjawiska te w konsekwencji zmieniają właściwości organoleptyczne i zmniejszają bezpieczeństwo produktów na bazie ryb. Przytoczono dane dotyczące autoinduktorów u *Pseudomonas aeruginosa*. Sposoby ingerencji w system QS i mechanizm działania różnych czynników z uwzględnieniem olejków eterycznych oraz ich zastosowanie w przetwórstwie ryb zostały krótko przedstawione w ostatniej części tego rozdziału. Reasumując, uważam, że rozdział ten prezentuje dobry poziom merytoryczny oraz językowy, jest bardzo ciekawy i znakomicie wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z tematem rozprawy.

Zarówno cel główny jak i cele szczegółowe zostały precyzyjnie określone (i dobrze przedstawione na schemacie) i umożliwiły sformułowanie 3 hipotez badawczych. Koncepcja rozwiązania założonego problemu badawczego jest klarowna i nie budzi żadnych zastrzeżeń recenzenta.

W części doświadczalnej pracy zajmującej 13 stron szczegółowo przedstawiono mikroorganizmy, użyte materiały, warunki hodowli i zastosowane metody eksperymentalne, modelowe i statystyczne. W tej części pracy brakowało mi odnośników do opublikowanych prac i niektórych szczegółów metodycznych. Np. przy ekstrakcji kwasów tłuszczowych drobnoustroje zawieszano w roztworze NaOH – jak określano ilość tych drobnoustrojów? Podobnie przy ekstrakcji autoinduktorów systemu QS z płynów pochodzących, ile było tego płynu, jak prowadzono taką hodowlę, czy warunki hodowli mogły mieć wpływ na profil AI systemu QS? Na stronie 29 błędnie użyto sformułowania bufor fosforowy, zamiast fosforanowy. Przy ocenie *in situ* wzrostu *P. psychrophila* w filetach świeżego łososia atlantyckiego zastosowano próby zawierające 10 g świeżej ryby – dlaczego zastosowano takie małe ilości produktu?

Wyniki badań przedstawione w pracach eksperymentalnych można zaliczyć do badań podstawowych, jednak z wyraźnym aspektem aplikacyjnym potwierdzającym ich potencjał do wykorzystania w przyszłości w przemyśle spożywczym i ochronie środowiska. Omówienie



wyników i dyskusja zajęły 48 stron. Tę część rozprawy rozpoczęto od charakterystyki składu olejku z estragonu oraz pieprzu czarnego i wskazania dominujących związków bioaktywnych. Następnie dla tych związków wyznaczone zostały stężenia subinhibicyjne, czyli takie które zapewniały inaktywację niepożądanych komórek drobnoustrojów ale nie pogarszały cech organoleptycznych produktu. W kolejnym etapie zbadano wpływ tych związków, zastosowanych we wskazanych stężeniach, na profil estrów metylowych kwasów tłuszczowych. Warto podkreślić, że te badania prowadzono w odniesieniu do 3 szczepów *Pseudomonas*, łącznie w trzech pożywkach co wygenerowało ogromną ilość wyników. Autorka zgrabnie poradziła sobie z analizą tych danych i wyciągnęła ciekawe wnioski. Dalej sprawdzono profil cząsteczek sygnałowych w płynach pochodzących z komórek 3 szczepów hodowanych w pożywce kontrolnej bez dodatku oraz suplementowanej olejkami i ich bioaktywnymi komponentami w stężeniach subinhibicyjnych. Wyniki jednoznacznie wykazały wpływ tych substancji na poziom syntezy autoinduktorów, a co za tym idzie ich potencjał do ingerencji w system QS *Pseudomonas* spp. Następnie potwierdzono możliwość już tylko bioaktywnych komponentów z olejków do wiązania się z białkami receptorowymi, a tym samym ingerencji w system QS *Pseudomonas* spp.

Charakterystyka pangenu i transkryptomu dla wybranego szczepu KM02 *P. psychrophila* wskazała obecność czynników decydujących o zdolności tych bakterii do rozkładu białek, degradacji lipidów i sekrecji enzymów co potwierdza ich znaczny potencjał do psucia ryb.

Kolejnym badanym elementem ingerencji w system QS w niniejszej pracy była ocena wpływu olejków eterycznych i ich bioaktywnych składników na białka systemu efflux i czynniki regulacyjne T2SS. W tej części nie jest dla mnie jasne dlaczego jako czynnik indukujący system efflux wybrano antybiotyk i do tego kwas nalidyksowy? Czy taki wybór będzie referencyjny w odniesieniu do wysuniętego wniosku nr 7? Niemniej za bardzo cenne uważam wyniki dokowania molekularnego, które dostarczyły dowodów na to, że główne składniki bioaktywne badanych olejków tworzą stabilne kompleksy z białkami systemu efflux i mogą przez to zaburzać system transport komórkowego i oddziaływać na mechanizm QS.

Bardzo ważnym elementem niniejszej pracy było oznaczenie wpływu olejków i ich składników na aktywność proteolityczną, lipolityczną oraz na syntezę egzopolisacharydów, które to aktywności są regulowane mechanizmem QS. Co więcej wpływ tych substancji zbadano także na poziomie molekularnym poprzez ocenę zmian w poziomie ekspresji wybranych genów kodujących proteazy, lipazy i genów odpowiedzialnych za syntezę alginianu, kodującego czynnik sigma α i anty-sigma α . W tych badaniach wykorzystano bakterie namnożone w modelowym podłożu hodowlanym oraz w pożywce z ryby (FJM). Wykazano znaczące obniżenie aktywności proteolitycznej i lipolitycznej ale i znaczną redukcję syntezy egzopolisacharydów, jednak wyniki były bardziej spektakularne w pożywce modelowej niż w pożywce FJM, w której zawartość białka i lipidów miała odwzorowywać



produkt – proszę skomentować na ile satysfakcjonujące w świetle ostatnich doniesień naukowych są otrzymane przez Panią rezultaty?

Aplikacyjny charakter przeprowadzonych badań potwierdziły ostatnie doświadczenia opisane w omawianej pracy doktorskiej, w których zbadano zmiany liczby bakterii szczepu KM02 w modelowym produkcie spożywczym potraktowanym marynatą z dodatkiem badanych olejków. Wyniki okazały się bardzo obiecujące i potwierdziły aktywność przeciwdrobnoustrojową olejku z pieprzu i estragonu, co w praktyce przekłada się przede wszystkim na wydłużenie okresu trwałości marynowanych produktów rybnych i ryb przechowywanych w warunkach chłodniczych. Tutaj mam tylko uwagę dotyczącą błędnie podanego na stronie 78 nr dokumentu 21, zamiast 23.

Na końcu manuskryptu znalazło się zgrabnie napisane podsumowanie oraz 10 dość ogólnych wniosków. Bibliografia zawiera 163 pozycje literaturowe, w tym 111 z ostatniej dekady.

Wniosek końcowy

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pani mgr inż. Natalii Małgorzaty Tomasz uważam, że Autorka w sposób prawidłowy przeprowadziła eksperymenty doświadczenia, dobrała metody analityczne i statystyczne, osiągnęła i zrealizowała zamierzony cel badań. Oceniana rozprawa doktorska jest oryginalna, dobrze zaplanowana i wykonana, potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktorantkę, wnosi elementy poznawcze do aktualnej wiedzy z zakresu technologii żywności, posiada ewidentny aspekt praktyczny, a uzyskane wyniki są również podstawą do rozważenia i rozpoczęcia kolejnych doświadczeń naukowych. Zatem stwierdzam, że przedłożone opracowanie naukowej całkowicie spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 187 ust.1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668 ze zm.). Wnoszę zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Technologii Żywności i Żywnienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o **dopuszczenie mgr inż. Natalii Małgorzaty Tomasz** do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie technologia żywności i żywnienia.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy zaprezentowanych wyników, ponadprzeciętny, szeroki i zaawansowany warsztat analityczny, jak również potencjał aplikacyjny wyników, wnioskuję o wyróżnienie przedłożonej mi do oceny rozprawy doktorskiej.

Wrocław, 17-09-2023


Prof. dr hab. Anita Rywińska