



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Poznań University of Life Sciences

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Autoreferat

Katarzyna Barbara Serwańska-Leja

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Poznań 2020

1. **Imię i nazwisko:** Katarzyna Barbara Serwańska-Leja
2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich przyznania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:**

Doktor inżynier nauk rolniczych w zakresie biotechnologii, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu; 2013.

Temat rozprawy doktorskiej: „*Charakterystyka aktywności metabolicznej Clostridium bifermentans zdolnych do syntezy 1,3-propanodiolu*”.

Magister inżynier biotechnologii, Wydział Rolniczy, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, 2008. Temat pracy magisterskiej: „*Wykorzystanie wodnych emulsyjnych układów dwufazowych do mikrokapsułkowania mikroorganizmów*”.

3. **Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.**

2009-2014 - Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności; asystent

IV-IX 2010 urlop macierzyński

2010-2014 - Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności: starszy referent techniczny

2014 – obecnie, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności: adiunkt

VI 2014-VI 2015 urlop macierzyński

4. **Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):**

- a) **tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:**

Cykl prac tworzących osiągnięcie naukowe pod wspólnym tytułem:

Ocena przeciwdrobnoustrojowej aktywności oraz mechanizmów działania roślinnych olejków eterycznych względem saprofitycznych bakterii *Pseudomonas orientalis*.

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

(wartość podanego wskaźnika impact factor zgodna z rokiem opublikowania)

1. Leja K., Czaczyk K. 2016. The industrial potential of herbs and spices - a mini review. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 15(4), 353-365.

IF = 0 MNiSW₂₀₁₆ = 12 pkt

2. Leja K., Szudera-Kończal K., Myszka K., Czaczyk K. 2019. Antibacterial effect of natural oils - an opportunity to solve the problem of antibiotic resistance on the example of *Pseudomonas* spp. *Advancements of Microbiology - Postep. Mikrobiol.*, 58, 177–190.

IF = 0,298 MNiSW₂₀₁₉ = 20 pkt

3. Leja K., Szudera-Kończal K., Światała E., Juzwa W., Kowalczewski P.Ł., Czaczyk K. 2019. The Influence of Selected Plant Essential Oils on Morphological and Physiological Characteristics in *Pseudomonas orientalis*. *Foods*, 8(7), 277; <https://doi.org/10.3390/foods8070277>

IF = 3,011 MNiSW₂₀₁₉ = 70 pkt

4. Leja K., Drożdżyńska A., Majcher M., Kowalczewski P.Ł., Czaczyk K. 2019. Influence of sub-inhibitory concentration of selected plant essential oils on the physical and biochemical properties of *Pseudomonas orientalis*. *Open Chem.*, 17, 492–505

IF = 1,512 MNiSW₂₀₁₆ = 70 pkt

5. Leja K., Majcher M., Juzwa W., Czaczyk K., Komosa M. 2020 Comparative evaluation of *Piper nigrum*, *Rosmarinus officinalis*, *Cymbopogon citratus* and *Juniperus communis* L. essential oils of different origin as functional antimicrobials in foods. *Foods*, 9, 141; <https://doi:10.3390/foods9020141>

IF = 3,011 MNiSW₂₀₁₉ = 70 pkt

Całkowity IF= 7,832, suma punktów MNiSW₂₀₁₆ = 12; MNiSW₂₀₁₉ = 230, liczba cytowań wg bazy Web of Science = 429 (402 bez autocytowań)

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

Wprowadzenie do problematyki

W wymienionych wyżej publikacjach, tworzących jednotematyczny cykl, nadrzędną hipotezą naukową było stwierdzenie, że roślinne olejki eteryczne, stosowane w niskich stężeniach, stanowią skuteczny środek hamujący wzrost saprofitycznych bakterii *Pseudomonas orientalis*, jednocześnie nie wykazując aktywności bakteriobójczej. Bakterie tego gatunku są słabo opisane w literaturze, znaleźć można jedynie szczątkowe informacje dotyczące ich właściwości fizjologicznych i biochemicznych. Wiadomo jednak, że naturalnym źródłem ich występowania są surowe ryby oraz woda źródłana. Dlatego też, realizując główny cel prac badawczych, którym było opisanie wpływu olejków eterycznych w niskich stężeniach na komórki bakterii, należało również skupić się na zbadaniu wpływu olejków na zmiany wewnątrzkomórkowego metabolizmu bakterii.

Podjęty temat ma bardzo długą historię, gdyż potencjał aplikacyjny olejków eterycznych doceniano już w czasach starożytnych. Wówczas wykorzystywane były one w trakcie balsamowania zwłok, a zapach drzewa sandałowego rozchodził się ze świątyń na terenie Mezopotamii. Sumerowie (starożytni mieszkańcy Dolnej Mezopotamii) chętnie korzystali z mieszanek roślinnych, które swym zapachem miały korzystnie wpływać na stan zdrowia człowieka. Sztukę aromaterapii znali także Chińczycy, którzy w czasach starożytnych stworzyli olejek znany pod nazwą „Balsam Tygrysi” (Levinson i Levinson, 1998). Roślinne olejki eteryczne doceniane były także ze względu na ich potencjał kulinarny. Szczególnym uznaniem cieszył się olejek pieprzu czarnego. Sam zaś pieprz nazywany był królem przypraw, a jego zastosowanie udokumentowano już w czasach królowej Sheeby i króla Salomona (1015-666 p.n.e.). Ostry smak pieprzu docenił także Neron – podobno jego ulubioną potrawą był chleb z miodem z dodatkiem pieprzu. W kuchni europejskiej pieprz zaczął być stosowany, gdy tylko dotarł do kontynentu około VI–V wieku przed naszą erą. Uważany był również za lek, gdyż stymuluje apetyt i pragnienie oraz łagodzi skutki przeziębienia (Nair, 2004; Lewkowicz-Mosiej, 2013).

Na podstawie przedstawionych doniesień historycznych wnioskować można, że już wówczas intuicyjnie wyczuwano, iż roślinne olejki eteryczne mają ogromny potencjał aplikacyjny. W dostępnej literaturze z początku XX wieku znaleźć można precyzyjne opisy zastosowania poszczególnych olejków, z rozróżnieniem ich składników bioaktywnych, jako związków aromatyzujących potrawy (m.in. Reilly, 1933; Penfold, 1934; Waygood, 1943). Pierwotnie nie zdawano sobie sprawy z tego, że olejki mogą pełnić także rolę naturalnych

konserwantów żywności. Jednak już w drugiej połowie lat 40. XX wieku obserwujemy pojawienie się prac dokumentujących ich przeciwbakteryjną aktywność (m.in. Hotchkiss, 1946; Bartels, 1947; Mossel i Westerdijk, 1949). Obecnie temat ten jest niezmiernie ważny i obecny w badaniach naukowych. Narastająca w ostatnich kilku dziesięcioleciach tendencja do stosowania wielu dodatków i konserwantów chemicznych napotykała na opór konsumentów. Wzrastająca świadomość społeczna zagrożeń wynikających ze spożywania ogromnych ilości związków chemicznych powoduje jednak konieczność zasadniczych zmian w przemyśle spożywczym, takich jak eliminowanie nadmiernej ilości syntetycznych dodatków na rzecz naturalnych. Doskonałą alternatywą są tu właśnie roślinne olejki eteryczne, które ze względu na znaczną zawartość składników bioaktywnych wykazują silne właściwości bakteriostatyczne, porównywalne ze środkami chemicznymi (Solórzano-Santos i Miranda-Novales, 2012).

Celem przedstawionego wyżej cyklu prac badawczych jest wskazanie potencjału aplikacyjnego olejków eterycznych pozyskiwanych z roślin jako naturalnych konserwantów żywności, podkreślenie ich roli w kwestii bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności, a także wyjaśnienie mechanizmów oddziaływania olejków na komórki bakterii na przykładzie mało poznanego gatunku bakterii – *P. orientalis*.

Pomimo że ukazało się wiele doniesień naukowych dotyczących przeciwdrobnoustrojowej aktywności olejków, jak również opisów prób wyjaśnienia mechanizmów ich działania, znaczna część z opublikowanych prac ogranicza się do badań ogólnych (strefy przejaśnienia, minimalne stężenie bakteriostatyczne i bakteriobójcze). Niewiele jest publikacji przedstawiających kompletny protokół analityczny, uzupełniony o analizę wpływu olejków na morfologię komórek bakterii, a także oznaczenie stężenia białek uwalnianych ze ściany komórkowej, wyznaczenie krzywych wzrostu bakterii w obecności olejków, czy wreszcie zastosowanie cytometrii przepływowej, w celu oznaczenia rzeczywistej żywotności komórek, w tym stwierdzenie występowania komórek niewykrywalnych typowymi metodami hodowlanymi, tzn. komórek żywych nie dających się hodować (ang. *viable but nonculturable*) (Silva i wsp., 2011). Jednakże dopiero tak właśnie zaplanowane i poprowadzone badania mogą dać pewną odpowiedź na pytanie, czy omawiane tu olejki w określonym stężeniu inhibującym rzeczywiście hamują wzrost badanych mikroorganizmów, a następnie dlaczego tak się dzieje.

W prezentowanym osiągnięciu naukowym wyszłam poza dotychczasowe podejście oceny działania przeciwdrobnoustrojowego olejków eterycznych klasycznymi metodami hodowlanymi i zestawiałam je z cytometryczną analizą poziomu aktywności metabolicznej wewnątrz komórek bakterii, a ponadto po raz pierwszy na świecie połączyłam te badania z analizą wpływu oddziaływania olejków eterycznych w stężeniach hamujących na szlaki metaboliczne bakterii. Poniżej przedstawiłam chronologiczne postępowanie badawcze, które pozwoliło z ukazanego cyklu publikacji wyciągnąć globalne wnioski przedstawione w podsumowaniu.

Pracę badawczą nad olejkami eterycznymi rozpoczęłam od dokładnej analizy literatury dotyczącej ich aplikacyjnego potencjału. Miało to pomóc wybrać węższą dziedzinę badawczą. Efektem studiów literaturowych jest publikacja:

1. Leja K., Czaczyk K. 2016. The industrial potential of herbs and spices - a mini review. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 15(4), 353-365.

W publikacji podkreślono, że substancje pochodzenia roślinnego stały się ostatnio przedmiotem zainteresowania wielu gałęzi przemysłu i gospodarki, w tym także medycyny, farmacji, kosmetologii i produkcji żywności (Elgayyar i in., 2001; Ncube i in., 2008). Aktywność przeciwdrobnoustrojowa ekstraktów roślinnych jest ważnym zagadnieniem w konfrontacji z opornością mikroorganizmów na antybiotyki. Bakterie mają genetyczną zdolność do przenoszenia i nabywania oporności na leki, dlatego szybki rozwój przemysłu farmakologicznego w ciągu ostatnich trzech dekad pociągnął za sobą wzrost oporności mikroorganizmów względem wielu substancji bakteriobójczych. W konsekwencji mogą występować nowe infekcje, szczególnie u pacjentów o słabym układzie odpornościowym. Konieczne jest ograniczenie tego problemu poprzez kontrolowanie stosowania antybiotyków, badania mechanizmów odporności genetycznej bakterii i, wreszcie, zaawansowane badania nad nowymi lekami, zwłaszcza pochodzenia naturalnego (Gislene i in., 2000). Ekstrakty roślinne zawierające związki wielopierścieniowe o działaniu estrogenowym (tzw. fitoestrogeny) można stosować w farmacji jako alternatywny sposób hormonalnej terapii zastępczej w leczeniu zaburzeń menopauzalnych. Co ważne, wiele badań epidemiologicznych sugeruje, że u kobiet w krajach o wysokim spożyciu takich fitoestrogenów ryzyko raka piersi jest mniejsze (Beck i in., 2003). Wykazano również, że ekstrakty pochodzenia ziołowego i przyprawowego mają właściwości prozdrowotne (Hinneburg i in., 2006).

Ze względu na korzystny potencjał ekstraktów roślinnych można je skutecznie stosować w utrzymaniu i wzmacnianiu piękna ludzkiej urody. Oprócz przeciwdrobnoustrojowej aktywności wyciągi z ziół i przypraw mają jeszcze inne korzystne właściwości, takie jak działanie nawilżające, przeciwutleniające i antycellulitowe. Ponadto, naturalne produkty, w przeciwieństwie do kosmetyków syntetycznych, są łagodne, biodegradowalne i mają niski profil toksyczności (Chanchal i in., 2008). Bardzo istotnym aspektem jest też zastępowanie chemicznych dodatków w żywności naturalnymi. Także w tym przypadku olejki dają ogromne możliwości głównie ze względu na ich właściwości bakteriostatyczne, ale również przeciwutleniające. Syntetyczne przeciwutleniacze, takie jak butylohydroksyanizol lub butylohydroksytoluen, dodawane są do produktów spożywczych, aby zahamować procesy prowadzące do pogorszenia jakości żywności (m. in, degradacji lipidów, węglowodanów i białek). Jednak takie przeciwutleniacze są lotne i łatwo rozkładają się w wysokich temperaturach, a ponadto nadal nie jest jasne, czy długotrwałe ich spożywanie może stanowić zagrożenie dla zdrowia człowieka. Wiele ziół i przypraw jest doskonałym źródłem związków fenolowych, o których wiadomo, że wykazują dobrą aktywność przeciwutleniającą i mogą być stosowane jako naturalne konserwanty żywności (Hinneburg i in., 2006).

Powyższe informacje potwierdzają hipotezę wskazującą na ogromny potencjał aplikacyjny olejków eterycznych, których korzystne oddziaływanie, chociażby lecznicze, znane było od stuleci. Ludzie intuicyjnie potrafili korzystać z ich prozdrowotnych właściwości. Obecnie posiadamy już ogromną wiedzę na temat składników bioaktywnych zawartych w olejkach roślinnych, a mechanizmy ich działania wciąż stanowią ważne zagadnienie prac naukowych. Przemysł spożywczy nieustannie się rozwija, wciąż poszukiwane są nowe rozwiązania zapewniające produkty bezpieczne, a jednocześnie atrakcyjne dla konsumenta. Obserwujemy więc tendencję do ograniczania stosowania chemicznych konserwantów w żywności na rzecz naturalnych. Pojawiają się nowe technologie wykorzystujące roślinne olejki eteryczne, jak na przykład produkcja biodegradowalnych czy też jadalnych opakowań inkrustowanych olejkami w celu przedłużenia okresu przydatności i produktu spożywczego.

Szczegółowa analiza potencjału aplikacyjnego roślinnych olejków eterycznych w przemyśle spożywczym stanowiła dla mnie podstawę do podjęcia dalszego tematu związanego z kształtowaniem się mechanizmów oporności w komórkach bakterii w odpowiedzi na chemiczne konserwanty oraz antybiotyki. Kwestie te zostały opisane w publikacji:

2. Leja K., Szudera-Kończal K., Myszką K., Czaczyk K. 2019. Antibacterial effect of natural oils - an opportunity to solve the problem of antibiotic resistance on the example of *Pseudomonas* spp. *Advancements of Microbiology - Postep. Mikrobiol.*, 58, 177–190.

Intensywny wzrost stosowania antybiotyków powoduje powstawanie mechanizmów oporności u bakterii w wyniku zmian chromosomalnych lub wymiany materiału genetycznego. Ten problem dotyczy wielu patogennych bakterii, w tym bakterii z rodzaju *Pseudomonas*. W powyższej pracy analizę problemu antybiotykoodporności przeanalizowano na przykładzie *P. aeruginosa*, który jest klinicznie ważnym patogenem z potwierdzoną odpornością na wiele antybiotyków, takich jak penicylina, cefalosporyny, aminoglikozydy, fluorochinolony i karbapenemy (Bhatt i wsp., 2019). Nadużywanie antybiotyków w leczeniu i przemyśle, także spożywczym, powoduje narastanie oporności, a tym samym uniemożliwia leczenie infekcji wywołanych przez bakterie. Konieczne jest zatem ograniczenie spożycia antybiotyków i poszukiwanie alternatywnych substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, które nie są antybiotykami (np. olejki eteryczne z roślin). Olejki eteryczne w rzeczywistości nie są olejkami, ale są bardzo słabo rozpuszczalne w wodzie. Olejki pochodzenia roślinnego można uzyskać z różnych części roślin, w tym z nasion, kwiatów, pąków, gałązek, liści, owoców i korzeni. Zazwyczaj wytwarza się je za pomocą technik ekstrakcji substancji zapachowych, takich jak destylacja (w tym destylacja z parą wodną), tłoczenie na zimno lub ekstrakcja (maceracja) (Doughari i wsp., 2012). Zasadniczo, olejki są złożonymi mieszaninami setek związków aromatycznych (Ali i wsp., 2014). Wszystkie te poszczególne składniki bioaktywne mają znaczącą aktywność i stąd też olejki posiadają właściwości przeciwdrobnoustrojowe (López i wsp., 2005), przeciwutleniające (Chang i wsp., 2001), przeciwgrzybiczne (Calo i wsp., 2015), przeciwwirusowe, przeciwpasożytnicze i owadobójcze (Ali et al., 2014).

Większość spośród poznanych olejków posiada status GRAS, co oznacza, że ogólnie uznane są za substancje bezpieczne dla zdrowia konsumentów (ang. *generally recognized as safe*). Dzięki temu, a także ze względu na przyjemny zapach oraz właściwości przeciwdrobnoustrojowe, można je stosować w produktach spożywczych (Bhatt i wsp., 2019; Blair i wsp., 2015; Murray i wsp., 2015). Chociaż przemysł spożywczy wykorzystuje głównie olejki jako aromaty, to jednak stanowią one także bogate źródło naturalnych środków przeciwdrobnoustrojowych do konserwacji żywności, co obecnie jest przedmiotem wielu

badania i prac naukowych (Banu i wsp., 2017; Dzierżanowska, 2000; Edris, 2007; Guerra-Rosas i wsp., 2016). Zainteresowanie olejkami i ich zastosowaniem w konserwowaniu żywności znacznie wzrosło w ostatnich latach dzięki coraz bardziej negatywnemu postrzeganiu przez konsumentów syntetycznych konserwantów (Guerra-Rosas i wsp., 2016). Wykazano, że olejki są w stanie zahamować wzrost niektórych bakterii psujących żywność, takich jak *Clostridium* spp. (m.in. *C. botulinum* oraz *C. perfringens*) (He i Spain, 1997), *Bacillus* spp. (*B. stearothermophilus*, *B. cereus*) (Drenkard, 2002), *Lactobacillus* spp. (*L. acidophilus*) (Lai i wsp., 2018), a także *Pseudomonas* spp. (*P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. lundensis*, *P. fragi*, *P. putida*, *P. orientalis*) (Behki i wsp., 1986; Larbig i wsp., 2010; Lee, 2015).

Podsumowując, informacje zawarte w publikacji pt. Antibacterial effect of natural oils - an opportunity to solve the problem of antibiotic resistance on the example of *Pseudomonas* spp. Potwierdzają fakt, że bakteryjna adaptacja do antybiotyków oraz konserwantów w ostatnich dekadach była bardzo udana. Nastąpił znaczny wzrost oporności bakterii na antybiotyki i chemiczne konserwanty. Dalsze nadużywanie syntetycznych związków bakteriobójczych doprowadzi do poważnych konsekwencji, w tym wzrostu liczby szczepów multiopornych patogenów. Dlatego też zadaniem współczesnych naukowców jest dobranie naturalnych substancji o działaniu bakteriostatycznym, działających w niskim stężeniu, co chroni przed aktywacją w komórkach bakterii mechanizmów opornościowych. Analiza danych literaturowych jednoznacznie wskazuje, że dobrze dobrane roślinne olejki eteryczne mogą stanowić rozwiązanie tego problemu.

Pomimo licznych pionierskich prac, w których podjęto próbę wyjaśnienia sposobu przeciwdrobnoustrojowego działania poszczególnych składników olejków w modelowych produktach spożywczych (m.in. Banu i wsp., 2017; Dzierżanowska, 2000; Edris, 2007), wciąż brakuje szczegółowych informacji na temat mechanizmów przeciwdrobnoustrojowego działania olejków. Ponadto, tylko nieliczne prace naukowe proponują rozbudowane procedury badawcze związane z potwierdzeniem bakteriostatycznego działania wybranych olejków na mikroorganizmy. Dlatego też to zagadnienie stanowiło podstawę moich kolejnych prac eksperymentalnych.

3. Leja K., Szudera-Kończal K., Światała E., Juzwa W., Kowalczewski P.Ł., Czaczyk K. 2019. The Influence of Selected Plant Essential Oils on Morphological and Physiological

W pierwszym etapie badań sprawdzono aktywność przeciwdrobnoustrojową 9 olejków wybranych spośród 15 na podstawie przeprowadzonych analiz sensorycznych, podczas których grupa 25 osób wypełniała ankietę konsumencką dotyczącą smaku, zapach i wyglądu łososia w marynacie sporządzonej z poszczególnych olejków (dane niepublikowane). Do analiz aktywności przeciwdrobnoustrojowej zakwalifikowano następujące olejki roślinne: z bergamotki (*Citrus bergamium*), z gałki muskatołowej (*Myristica fragrans*), z gorzkiej pomarańczy (*Citrus aurantium* L.), z limonki (*Citrus aurantifolia*), z trawy cytrynowej (*Cymbopogon citratus*), z jałowca (*Juniperus communis* L.), z czarnego pieprzu (*Piper nigrum*), z rozmarynowy (*Rosmarinus officinalis*) oraz olejek z dziurawca zwyczajnego (*Hypericum perforatum*). Odrzucono olejki z oregano (*Origanum vulgare*), z tymianku (*Thymus vulgaris*), z mandarynki (*Citrus reticulata*), z szalwii (*Salvia officinalis*), z drzewa herbacianego (*Melaleuca alternifolia*) oraz z anyżu (*Pimpinella anisum*). Dla olejków (spośród 9 badanych), dla których w metodzie krążkowo-dyfuzyjnej zaobserwowano strefę przejaśnienia związaną z ich aktywnością bakteriostatyczną względem badanych bakterii *P. orientalis*, wyznaczono minimalne stężenia hamujące (MIC). Analizy prowadzono zarówno w temperaturze 36°C, jak i 15°C. Wyniki dla hodowli prowadzonych w 15°C odczytywane były po 72 godzinach. Spośród 9 testowanych olejków aż 7 wykazywało działanie bakteriostatyczne względem bakterii *P. orientalis*. Najwyższy stopień zahamowania wzrostu bakterii zaobserwowano w przypadku olejków z rozmarynu, czarnego pieprzu, jałowca, trawy cytrynowej i gorzkiej pomarańczy. Jednocześnie stwierdzono brak aktywności bakteriobójczej stosowanych olejków. Dla potwierdzenia tej tezy komórki bakterii poddane inkubacji z olejkami o potwierdzonej aktywności bakteriostatycznej – w stężeniu hamującym – poddano analizie cytometrycznej. W rezultacie komórki podzielone zostały na 3 frakcje metaboliczne - o wysokiej, średniej i niskiej aktywności metabolicznej, co pozwoliło ocenić, jak zmienia się wewnątrzkomórkowa aktywność komórek bakterii pod wpływem działania olejków w niskich stężeniach. Znaczący spadek aktywności metabolicznej (najwyższy procentowy udział komórek we frakcji o najniższej aktywności) zaobserwowano w przypadku dodatku do hodowli olejku rozmarynowego, olejku z trawy cytrynowej oraz bergamotki. Podkreślić jednak należy, że w żadnym z wariantów udział tych komórek nie przekroczył 50%, są to ponadto komórki wciąż

żywe, ich metabolizm jest jedynie osłabiony. Cytometria przepływowa jest użytecznym i czułym narzędziem analitycznym stanowiącym alternatywę dla typowych metod hodowlanych. Umożliwia dokładne i szybkie analizy żywotności na poziomie pojedynczych komórek (Nguefack i wsp., 2004). Technika ta została wykorzystywana także m.in. w pracy Nguefack i wsp. (2004) do oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej olejków eterycznych z trawy cytrynowej (*Cymbopogon citratus*), bazylii eugenolowej (*Ocimum gratissimum*) i tymianku pospolitego (*Thymus vulgaris*) przeciwko *Listeria innocua*. Silva i wsp. za pomocą cytometrii (Silva i wsp., 2011) badali działanie przeciwbakteryjne olejku kolendrowego (*Coriandrum* L.) względem bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych, w tym *P. aeruginosa*. Wyniki były prezentowane jako procentowy spadek żywotności komórek. Paparella i wsp. (2011) zastosowali cytometrię przepływową do oceny przeciwdrobnoustrojowego działania olejków eterycznych z oregano (*Origanum vulgare*), tymianku (*Thymus vulgaris*) i cynamonu (*Cinnamomum* L.) względem *Listeria monocytogenes*. Autorzy porównali także wyniki z klasycznych metod hodowlanych z wynikami uzyskanymi z analiz cytometrycznych, wskazując na nieprecyzyjność tych pierwszych. Jako powód podali istnienie subpopulacji komórek niehodowlanych – o bardzo niskiej aktywności metabolicznej, tzw. VNBC., które nie są wykrywalne w typowych metodach hodowlanych.

W kolejnym etapie badań przeprowadzono analizę wpływu olejków w wyznaczonych stężeniach hamujących na kształt komórek bakterii. W rezultacie okazało się, że komórki nie wykazywały już typowego kształtu pałeczki, stawały się okrągłe. Jest to spowodowane uszkodzeniem błony komórkowej, co prowadzi do częściowego wycieku zawartości komórki – komórki kurczą się, ale jednocześnie wykazują tendencję do aglomerowania. Ponieważ zmiany kształtu komórek są bezpośrednio związane ze zmianami w błonie białkowo-lipidowej bakterii, w następnym etapie pracy oznaczone zostało stężenie białka uwalnianego poza komórkę. Należało przy tym uwzględnić fakt, że bakterie z rodzaju *Pseudomonas* są w stanie naturalnie wytwarzać dużą ilość pozakomórkowych substancji polimerowych (EPS – ang. *extracellular polymeric substances*), w tym także egzopolisacharydów. Substancje te są syntetyzowane w celu ochrony komórek przed niekorzystnymi czynnikami fizycznymi i chemicznymi (takimi jak brak wody, gwałtowne zmiany temperatury i środki dezynfekujące) (Hall i wsp., 2018). Dlatego też konieczne było wyznaczenie stężenia białek pozakomórkowych w próbie kontrolnej (bez inkubacji z olejkami eterycznymi). W hodowlach inkubowanych z olejkami

eterycznymi w stężeniach hamujących zaobserwowano dwukrotny wzrost stężenia białka, co potwierdza powyższą hipotezę. Podobne obserwacje opisali również Nazzaro i wsp. (2013), stwierdzając, że olejki eteryczne i ich poszczególne składniki powodują znaczny wypływ białek z komórek bakterii.

Przeprowadzone przeze mnie analizy udowadniają różnorodność mechanizmów oddziaływania olejków eterycznych na komórki bakterii, m.in. oddziaływanie na błonę białkowo-lipidową i uwalnianie białek, co skutkuje zmianami kształtu komórki, a także obniża wewnątrzkomórkową aktywność metaboliczną bakterii. Należy podkreślić zaobserwowane różnice we wrażliwości obu szczepów – *P. orientalis* P49 oraz *P. orientalis* P110 na poszczególne olejki, co z kolei wskazuje na znaczną bioróżnorodność w obrębie gatunku *P. orientalis*.

Na podstawie badań do dalszych analiz wybrano olejki z czarnego pieprzu, rozmarynu, trawy cytrynowej i jałowca. Olejek z gorzkiej pomarańczy, pomimo dobrych właściwości bakteriostatycznych, został wyeliminowany, ponieważ jego ocena w teście sensorycznym była relatywnie gorsza.

Dalsze badania nad olejkami eterycznymi zaprezentowane zostały w publikacji:

4. Leja K., Drożdżyńska A., Majcher M., Kowalczewski P.Ł., Czaczyk K. 2019. Influence of sub-inhibitory concentration of selected plant essential oils on the physical and biochemical properties of *Pseudomonas orientalis*. *Open Chem.*, 17, 492–505

Badania naukowe potwierdzają, że roślinne olejki eteryczne w niskich stężeniach nie powodują śmierci komórek, ale wpływają między innymi na ich aktywność wewnątrzkomórkową. Stąd też celem badawczym niniejszej pracy było określenie wpływu, wybranych podczas realizacji wcześniejszych badań, olejków eterycznych (olejek z pieprzu czarnego, rozmarynu, jałowca i trawy cytrynowej) na właściwości fizyczne i biochemiczne komórek bakterii na przykładzie saprofitycznego szczepu *Pseudomonas orientalis* wyizolowanego z surowego filetu z łososia. Olejki ekstrahowane były metodą hydrodestylacji z materiału roślinnego. W dostępnej literaturze, opisującej zagadnienie bakteriostatycznego działania olejków względem mikroorganizmów, badania związane z ich wpływem na takie parametry, jak zdolność bakterii do syntezy indolu, obecność ureazy, zdolność do asymilacji i fermentacji sacharydów nie zostały uwzględnione. Jednakże analiza oddziaływania olejków

na wewnątrzkomórkowy metabolizm bakterii stanowi niezbędny aspekt badawczy dla pełnego wyjaśnienia mechanizmów przeciwbakteryjnego działania olejków roślinnych. Ponadto daje odpowiedź na pytanie, czy zastosowanie olejków jako naturalnych konserwantów nie spowoduje znaczących zmian w podstawowych szlakach metabolicznych bakterii i nie spowoduje powstania nowych niepożądanych produktów – aspekt ten jest szczególnie istotny w przemyśle spożywczym.

Gatunek *P. orientalis* nie został dotąd przebadany pod kątem właściwości fizycznych i biochemicznych, należało zatem uzupełnić tę wiedzę. Analizom podlegały 2 szczepy, *P. orientalis* P49 oraz *P. orientalis* P110 pochodzące z kolekcji Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności. Badania wykazały, że oba szczepy mają naturalną zdolność do ruchu, wykazują zdolność do produkcji indolu oraz brak zdolności do syntezy ureazy. W kolejnym etapie pracy wyznaczono wartości MIC dla poszczególnych olejków oraz oznaczono jakościowo i ilościowo zawartość składników bioaktywnych w olejkach. Olejki eteryczne z trawy cytrynowej, pieprzu, rozmarynu i jałowca, w stężeniu hamującym, wpłynęły jedynie na zdolność bakterii do ruchu, co prawdopodobnie związane jest z uszkodzeniem wici. Podobne obserwacje opisał Hyldgaard i wsp. (2012), wskazując, że karwakrol w stężeniu odpowiadającym wartości MIC nie wykazuje działania bójczonego względem bakterii *E. coli*, bakterie tracą jednak zdolność do ruchu. W pracy tej udowodnione zostało, że roślinne związki bioaktywne hamują syntezę flageliny, białka budującego wicę bakteryjną, a ponadto zaburzają potencjał błony komórkowej, tym samym osłabiając siłę protonową niezbędną do napędzania ruchu wici. Utrata zdolności do ruchu komórek jest także związana ze zmianą ich kształtu. Obserwacje mikroskopowe komórek poddanych 24-godzinnej inkubacji w obecności olejków w stężeniach hamujących wykazały zmianę kształtu z pałeczki (typowe wymiary komórek wynoszą 1,15 μm długości i 0,49 μm szerokości) w ziarniak (w przypadku wszystkich badanych olejków). Niekiedy zaobserwować można tendencję komórek do agregowania. Zmiany morfologiczne bakterii związane są z degradacją błon komórkowych i wyciekaniem składników wewnątrzkomórkowych pod wpływem działania olejków eterycznych (Nazzaro i wsp., 2013). Oddziaływanie olejków eterycznych na błonę komórkową bakterii jest możliwe, ponieważ hydrofobowe składniki olejków łatwo przenikają przez błonę i zaburzają selektywność transportu molekularnego (Khorshidian i wsp., 2018). W kolejnym etapie moich badań oceniona została zdolność obu szczepów *P. orientalis* do asymilacji sacharydów. W rezultacie

wykazana została zdolność do asymilacji D-glukozy, D-fruktozy, D-ksylozy, D-mannozy, L-arabinozy, D-galaktozy, glicerolu, D-sorbitolu, D-mannitolu, rybozy, α -laktozy, amylozy, amylopektyny, glutaminy, skrobi i D-trehalozy oraz brak zdolności do asymilacji sacharozy, D-maltozy, D-melibiozy, maltotriozy, rafinozy, inuliny i L-ramnozy. Ta tendencja nie ulegała zmianie po wzbogaceniu hodowli bakteryjnej o olejki eteryczne w stężeniach hamujących. Badania pokazały, że bakterie *P. orientalis* wykazują słabe właściwości fermentacyjne. Jedynie w hodowlach, w których źródło węgla stanowiła glukoza, glicerol, mannitol, ksyloza, skrobia, fruktoza, amylopektyna, laktoza, glutamina i amyloza, zaobserwowano syntezę kwasów organicznych (mlekowego, bursztynowego i L-piroglutarowego) oraz etanolu. Wydajność konwersji substratu do metabolitu końcowego była jednak we wszystkich hodowlach bardzo niska. Ważną obserwacją jest natomiast to, że dodatek olejków eterycznych w stężeniach hamujących nie wpłynął znacząco na metabolizm bakterii. Obniżona została jedynie wydajność syntezy kwasów o ok 40%. Brak znaczącej zmiany kierunku metabolizmu pod wpływem działania olejków w niskich stężeniach jest szczególnie istotny w przemyśle spożywczym, gdzie dodatkowe produkty metabolizmu mogłyby wpłynąć na smak, zapach, wygląd, a także zdrowotność produktów żywnościowych.

Wyniki badań przedstawione w tej publikacji stanowią kolejny, niepodważalny dowód na to, że olejki eteryczne w stężeniach hamujących nie wykazują działania bakteriobójczego względem komórek bakteryjnych. Ponadto, jest to pierwsza praca, w której opisany został wpływ olejków roślinnych na szlaki metaboliczne bakterii (zdolność do asymilacji i fermentacji sacharydów). Jednocześnie, prezentowane powyżej badania stanowią źródło informacji o właściwościach fizjologicznych i metabolicznych saprofitycznego gatunku *P. orientalis*, który do tej pory nie został dokładnie zbadany i opisany.

Kolejne badania przeprowadziłam mając na względzie aspekty porównawcze efektywności przeciwdrobnoustrojowego działania olejków z pieprzu czarnego, rozmarynu, jałowca i trawy cytrynowej w formie gotowych komercyjnie dostępnych produktów z olejkami pozyskiwanymi w laboratorium Instytutu Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu:

5. Leja K., Majcher M., Juzwa W., Czaczyk K., Komosa M. 2020 Comparative evaluation of *Piper nigrum*, *Rosmarinus officinalis*, *Cymbopogon citratus* and *Juniperus communis*

L. essential oils of different origin as functional antimicrobials in foods. Foods, 9, 141;
<https://doi:10.3390/foods9020141>

Celem tej pracy było porównanie przeciwdrobnoustrojowej aktywności handlowych olejków z pieprzu czarnego, rozmarynu, trawy cytrynowej i jałowca (wyselekcjonowanych podczas wcześniejszych badań) z olejkami ekstrahowanymi z materiału roślinnego (Eco Farma, Łódź) w laboratorium Instytutu Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu metodą hydrodestylacji. Często można się spotkać z opinią, że powszechnie dostępne na rynku olejki są niskiej jakości, zawierają mniej substancji bioaktywnych, niż deklaruje producent, a ich główny składnik stanowi olej nośnikowy. Jak wiadomo, o jakości produktu końcowego przesądza wiele czynników, w tym surowiec (rośliny bywają zanieczyszczone pestycydami), przebieg procesu przetwarzania (m.in. dodatek chemicznych rozcieńczalników), pakowanie i przechowywanie (ekspozycja na światło, ciepło i tlen powoduje degradację biochemiczną składników olejków). Jednak kluczowym czynnikiem decydującym w dużej mierze o składzie składników bioaktywnych jest sama roślina (w tym także to, z jakiej jej części olejek jest pozyskiwany). Ponieważ materiał roślinny trudno wystandaryzować, skład olejku powinien być wyznaczany dla każdej partii produktu osobno. Z tego powodu wszystkie etapy badań, w tym wyznaczenie wartości MIC dla poszczególnych olejków, zostały przeprowadzone niezależnie dla obu typów olejków.

W pierwszym etapie pracy dokonano analizy ekonomicznej, polegającej na zestawieniu kosztów zakupu 10 ml gotowego olejku handlowego z kosztami materiału roślinnego w ilości umożliwiającej pozyskanie takiej samej ilości olejku. Okazało się, że w przypadku pieprzu kwoty te są zbliżone. Pamiętać jednak należy, że nie zostały tu wliczone koszty produkcji (w przypadku olejków pozyskiwanych w laboratorium). Koszt zakupu materiału roślinnego w przypadku jałowca 1,5-rza przekroczył koszt zakupu gotowego olejku, a w przypadku rozmarynu i trawy cytrynowej był niemal 3-krotnie wyższy. Kolejnym krokiem było więc porównanie składu ilościowego i jakościowego obu typów olejków. Okazało się, że olejek rozmarynowy ma bardzo zbliżony skład niezależnie od pochodzenia. Wyraźna różnica ilościowa została odnotowana jedynie w przypadku zawartości w nim 1,8-cyneolu (eukaliptolu). Olejek otrzymywany w naszym laboratorium zawierał ok. dwukrotnie więcej tego składnika (44%) niż olejek handlowy (18%). Olejek handlowy z czarnego pieprzu różnił się od olejku uzyskanego przez nas pod względem obecności poszczególnych składników

bioaktywnych. Handlowy preparat zawierał zdecydowanie mniej składników. W olejku ekstrahowanym w naszym laboratorium stwierdzono obecność 19 związków chemicznych, w handlowym tylko 8. Podkreślić jednak należy, że większość związków bioaktywnych nieobecnych w olejku handlowym z pieprzu znajdowała się w olejku pozyskiwanym w naszym laboratorium w niskich stężeniach (ok 1%). Wyższe stężenia zaobserwowano w przypadku β -mircenu (2,3%), α -phellandrenu (4,6%), β -phellandrenu (2,9%) oraz α -terpinenu (15,8%). W olejku z trawy cytrynowej pozyskanym w naszym laboratorium, w odróżnieniu od olejku handlowego, wykryto obecność 1.8-cineonu (4.3%) i kamfory (4.5%). Okazało się także, że olejek ekstrahowany przez nas (31,2%) posiada o połowę mniej cytralu niż handlowy (67%). Olejek z jałowca pozyskany z materiału roślinnego firmy Eco Farm również wykazywał różnice w składzie jakościowym w porównaniu z jego handlowym odpowiednikiem (19 substancji bioaktywnych w porównaniu do zaledwie 5 w olejku handlowym). Większość spośród składników nieobecnych w handlowym preparacie obecna była w olejku przez nas pozyskanym w niskim stężeniu (ok 1%). Wyjątek stanowiły: sabinen (5,21%), α -terpinen (5,5%), limonen (9,1%) oraz β -kariofilen (8,5%), których obecności nie odnotowaliśmy. Zaobserwowano także znaczne różnice w zawartości α -pinenu (33,1% w porównaniu do 1% w olejku handlowym) oraz (β -mircenu 18,1% do 1% w olejku handlowym).

Powyżej opisane różnice dotyczące zawartości poszczególnych składników bioaktywnych w obu typach olejków znacząco wpłynęły na wartość minimalnego stężenia hamującego. Wartości MIC były około 10 razy niższe dla olejków uzyskanych w naszym laboratorium niż dla olejków handlowych, w przypadku obu testowanych szczepów. Dla obu szczepów, *P. orientalis* P49 i *P. orientalis* P110, największą różnicę w wartości MIC zaobserwowano w przypadku olejku z trawy cytrynowej (wartość MIC dla olejku laboratoryjnego była ponad 20 razy niższa niż olejku handlowego). Ponadto, wszystkie olejki laboratoryjne hamowały w wyższym stopniu namnażanie się bakterii, w przypadku obu szczepów *P. orientalis*. Obserwacje te wskazywać mogą na silne synergistycznie oddziaływanie pomiędzy poszczególnymi składnikami bioaktywnymi zawartymi w olejkach eterycznych. Efekt synergiczny w przypadku składników olejków opisany został w wielu pracach. Między innymi Cassella i in. (2002) potwierdzili synergiczne działanie olejków eterycznych z drzewa herbacianego i lawendy, wobec *Trichophyton rubrum* i *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* stanowiących najczęstszą przyczynę zakażeń grzybiczych u ludzi.

Ponieważ zarówno metoda krążkowa oznaczania wrażliwości bakterii na poszczególne olejki, jak i metoda szeregowych rozcieńczeń stosowana w celu wyznaczenia wartości MIC są obciążone błędami, uzyskane wyniki wymagały dodatkowego potwierdzenia poprzez określenie krzywych wzrostu bakterii w obecności oleju jak i bez oleju (test kontrolny), a także za pomocą cytometrii przepływowej, która umożliwiła podział komórek na 3 grupy zależnie od ich aktywności (wysoka, średnia, niska aktywność metaboliczna). Wyznaczone krzywe wzrostu potwierdziły bakteriostatyczne działanie olejków w zastosowanych stężeniach. Bardziej efektywnie działały olejki laboratoryjne – olejek jałowcowy obniżył liczebność bakterii *P. orientalis* P49 o około 5 cykli logarytmicznych w porównaniu z próbą kontrolną bez olejku, podczas gdy jego handlowy odpowiednik o około 3 cykle logarytmiczne, a laboratoryjny olejek z czarnego pieprzu o około 6 cykli logarytmicznych w przypadku *P. orientalis* P110 (handlowy odpowiednik o około 4 cykle logarytmiczne). Podobne obserwacje opisali Moraes-Lovison i wsp. (2017). Autorzy ci przedstawili działanie bakteriostatyczne *in vitro* olejku eterycznego ekstrahowanego z oregano wobec dwóch patogenów przenoszonych przez żywność - *S. aureus* i *E. coli*. Olejek z oregano na poziomie MIC hamował namnażanie się bakterii po 72 godzinach hodowli (około 5 cykli logarytmicznych w przypadku *E. coli* i 3 cykle u *S. aureus*).

Różnice w efektywności bakteriostatycznego działania obu typów olejków potwierdziły także analizy cytometryczne. Odsetek komórek o wysokiej aktywności metabolicznej był wielokrotnie niższy w przypadku olejów ekstrahowanych w naszym laboratorium w zestawieniu z olejkami handlowymi (w odniesieniu do wszystkich 4 zastosowanych w badaniach olejków). Najbardziej spektakularne efekty zaobserwowano w przypadku laboratoryjnego oleju z trawy cytrynowej (dla obu szczepów). Frakcja komórek aktywnych wynosiła tylko 1,6% dla szczepu P49 i 1,2% w przypadku szczepu P110. Bardzo skuteczny okazał się laboratoryjny olejek z czarnego pieprzu - odsetek komórek we frakcji aktywnej spadł poniżej 30%. Dodatkowo prowadzone badania potwierdziły obecność komórek o bardzo niskiej aktywności metabolicznej, które nie są wykrywane w typowych metodach hodowlanych.

Wcześniejsze badania dowiodły, że składniki olejków eterycznych wywołują uszkodzenia błony i ściany komórkowej (uwalnianie białek), powodując zmianę kształtu komórek bakterii, a także wyptyw cytoplazmy. Analogiczne badania przeprowadzono dla olejków pozyskanych

w naszym laboratorium. Wszystkie stosowane olejki, podobnie jak preparaty handlowe, spowodowały skrócenie się komórek, przez co straciły one typowy kształt pałeczek i stały się okrągłe. Wymiary komórek traktowanych laboratoryjnymi olejkami eterycznymi z pieprzu czarnego, rozmarynu, jałowca i trawy cytrynowej były zbliżone do wymiarów komórek inkubowanych w obecności olejków handlowych. Zestawiono także wyniki stężenia białek uwalnianych z komórek bakterii pod wpływem działania olejków eterycznych. Olejki pozyskane w naszym laboratorium powodowały większy wyciek białek poza komórkę. Najbardziej efektywny odpływ białek zaobserwowano w przypadku olejków z trawy cytrynowej i czarnego pieprzu. Olejki eteryczne naruszają integralność błony komórkowej i powodują częściowy lub całkowity wyciek zawartości komórek (w tym białek, np. enzymów). Wzrost stężenia białka jest również związany ze zdolnością bakterii do syntezy egzopolisacharydów (Nazzaro i in., 2013).

Oba rodzaje olejów z pieprzu czarnego, jałowca, rozmarynu i trawy cytrynowej wykazywały działanie bakteriostatyczne w niskim stężeniu, oznaczanym jako MIC. Olejki destylowane w naszym laboratorium wykazywały jednak aktywność przeciwdrobnoustrojową w przynajmniej 10-krotnie niższym stężeniu, a ich działanie względem komórek bakterii było bardziej skuteczne. Jest to prawdopodobnie wynik synergicznego oddziaływania poszczególnych składników bioaktywnych (olejki laboratoryjne zawierały więcej rodzajów składników bioaktywnych). Potwierdza to tezę, że decydujące znaczenie ma dobór wysokiej jakości materiału roślinnego do produkcji olejków. Obserwacje te są szczególnie ważne dla przemysłu spożywczego, w którym dawki olejów powinny być jak najniższe i nie powinny negatywnie wpływać na właściwości organoleptyczne produktów. Ponadto, w tak niskich stężeniach olejki nie wykazują właściwości cyto- i genotoksycznych.

Podsumowanie

Całościowe spojrzenie na opisane badania dowodzi, że olejki eteryczne ekstrahowane z pieprzu czarnego, jałowca, rozmarynu oraz trawy cytrynowej posiadają, w niskich stężeniach, bakteriostatyczne działanie względem badanego saprofitycznego gatunku bakterii *P. orientalis*, odpowiedzialnego za psucie się produktów rybnych. Udokumentowany ponadto brak działania bakteriobójczego jest bardzo ważnym aspektem, wskazującym na fakt, że bakterie w kontakcie z odpowiednio dobranymi stężeniami olejków, nie uruchamiają w komórkach mechanizmów oporności, dzięki czemu w przyszłości nie pojawi się problem

uodpornienia bakterii na związki bioaktywne zawarte w olejkach. Obserwacje te stanowią potwierdzenie postawionej na początku badań hipotezy naukowej, że roślinne olejki eteryczne, stosowane w niskich stężeniach, stanowią skuteczny środek hamujący wzrost saprofitycznych bakterii *P. orientalis* i mogą być z powodzeniem stosowane w miejsce chemicznych konserwantów. Dodając do tego fakt, iż poziom świadomości konsumentów w zakresie zagrożeń związanych z dużym stężeniem związków chemicznych (konserwantów) w żywności jest coraz wyższy, wyłania się chęć poszukiwania produktów bezpiecznych, o możliwie naturalnym składzie. Producenci żywności są skłonni poszukiwać nowatorskich rozwiązań tego problemu, a powyższe badania przychodzą im z pomocą i potwierdzają fakt, że roślinne olejki eteryczne, ze względu na zróżnicowaną, bogatą zawartość składników bioaktywnych, mogą z powodzeniem stanowić alternatywę dla konserwantów chemicznych. Ważnym aspektem w przemyśle spożywczym jest fakt, że wiele z nich posiada status GRAS, a ponadto stosowane w stężeniach hamujących wzrost bakterii nie wykazują negatywnego oddziaływania na żywe komórki, nie uruchamiają także mechanizmów opornościowych w komórkach bakterii. Badania opisane w powyższym cyklu wskazują jednak, jak ważny jest precyzyjny dobór odpowiedniego stężenia olejków. Stanowią także dowód, że badania potwierdzające skuteczność ich działania powinny obejmować nie tylko klasyczne metody hodowlane, lecz również metody alternatywne, typu cytometria przepływowa umożliwiająca detekcję komórek w stanie bardzo niskiej aktywności fizjologicznej i metabolicznej. Niezmiernie ważnym aspektem, który uwzględniłam w swojej pracy, jest także analiza wpływu olejków na szlaki metaboliczne bakterii. Taka analiza daje nam odpowiedź, czy w produkcji spożywczym, w wyniku zastosowania dodatku olejków eterycznych, nie powstaną niepożądane produkty metabolizmu bakterii.

Zatem, biorąc pod uwagę powyższe konstatacje, za szczególnie ważne aspekty mej pracy badawczej i uzyskanych w niej wyników chcę wyróżnić:

1. Badania prowadzone były na szczepach *P. orientalis* pozyskanych z produktu spożywczego. Uwzględnione zostały więc procesy adaptacyjne bakterii do zmiennych warunków środowiskowych.
2. Klasyczne metody hodowlane (metoda krążkowo-dyfuzyjna, wyznaczenie minimalnych stężeń hamujących, wyznaczenie krzywych wzrostu bakterii w obecności olejków) zostały skonfrontowane z metodą alternatywną – cytometrią przepływową, co umożliwiło

wykazanie istnienia komórek o bardzo niskiej aktywności fizjologicznej i metabolicznej, które mogą stanowić zagrożenie dla bezpieczeństwa żywności w związku z brakiem ich wykrywalności konwencjonalnymi technikami. W większość prac naukowych opisujących przeciwdrobnoustrojową aktywność olejków eterycznych nie podjęto badań nad obecnością tego typu komórek.

3. Po raz pierwszy ocena bakteriostatycznej aktywności olejków eterycznych została rozbudowana o analizę ich wpływu na wewnątrzkomórkowe szlaki metaboliczne. Jest to bardzo ważny aspekt, ponieważ daje odpowiedź, czy nie zostają utworzone szkodliwe (lub o niepożądanym zapachu) produkty uboczne, co utrudniało by stosowanie olejków w produktach spożywczych. W rezultacie okazało się, że olejki nie zmieniają kierunku metabolizmu bakterii, obniżają jedynie efektywność konwersji sacharydów. Ten etap badań stanowi także źródło wiedzy o szlakach metabolicznych bakterii *P. orientalis*, które nie zostały dotąd zbadane i opisane. Analizy cytometryczne potwierdziły brak bakteriobójczego działania olejków w wyznaczonych stężeniach hamujących, co jest bardzo ważne z przemysłowego punktu widzenia i oznacza że olejki z powodzeniem stosowane mogą być w przemyśle spożywczym jako alternatywa dla konserwantów chemicznych.
4. Udowodnione zostały różnice w aktywności bakteriostatycznej olejków handlowych i tych pozyskiwanych „na świeżo” z roślin. Olejek eteryczny ekstrahowany z łodyg trawy cytrynowej wykazywał aktywność przeciwdrobnoustrojową w stężeniu ok 20 razy niższym niż komercyjny odpowiednik. W przypadku pieprzu czarnego, jałowca i rozmarynu stężenia hamujące olejków ekstrahowanych z roślin były ok. 10 razy niższe niż wyznaczone dla preparatów handlowych. Obserwacje te dowodzą, jak ważne jest źródło pozyskania olejków. Zastosowanie niższych stężeń umożliwia uniknięcie problemu wpływania olejków na właściwości organoleptyczne produktów spożywczych.
5. Wykazana została zmienność właściwości biochemicznych obu badanych szczepów *P. orientalis* oraz różnice we wrażliwości na odpowiednio dobrane stężenia olejków eterycznych, co wskazuje jak ważne jest indywidualne wyznaczanie stężeń hamujących dla szczepów izolowanych z prób środowiskowych (zmienność adaptacyjna).

Powyższe wyniki wyznaczają i dają trop nowym trendom badawczym, gdyż wykazały że dla odpowiedniego doboru stężeń olejków eterycznych wykazujących aktywność przeciwdrobnoustrojową, należy zastosować pełen zaproponowany powyżej protokół analityczny, a ponadto warto przeanalizować bakteriostatyczną aktywność poszczególnych składników bioaktywnych, których procentowa zawartość była na znacząco różnym poziomie w poszczególnych badanych olejkach eterycznych (m.in. 1,8-cyneol, β -mircen; β -phellandren; kamfora). Badania te pozwolą na oznaczenie synergicznego działania kluczowych, ze względu na przeciwdrobnoustrojową aktywność, składników olejków.

Literatura:

Ali M.S., Ravikumar S., Beula J.M., Anuradha V., Yogananth N. Insecticidal compounds from Rhizophoraceae mangrove plants for the management of dengue vector *Aedes aegypti*. J. Vector Borne Dis. 51, 106–114 (2014).

Banu S.F., Rubini D., Rakshita S., Chandrasekar K., Murugan R., Wilson A., Gowrishankar R., Pandian S.K., Nithyanand P. Antivirulent properties of underexplored *Cinnamomum tamala* essential oil and its synergistic effects with DNase against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms – an in vitro study. Frontiers Microbiol. 8, 1144 (2017).

Bartels H.A. The effect of eugenol and oil of cloves on the growth of microorganisms. Am. J. Orthod. Oral Surg. 33(6), 458-465 (1947).

Beck V., Unterrieder E., Krenn L., Kubelka W., Jungbauer A. Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 84, 259–268 (2003).

Behki R.M., Khan S.U. Degradation of atrazine by *Pseudomonas*: N-dealkylation and dehalogenation of atrazine and its metabolites. J. Agric. Food Chem. 34, 746–749 (1986).

Bhatt P., Rathi K.R., Hazra S., Sharma A., Shete V. Prevalence of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in burn patients at a tertiary care centre. IJB 23(1) (2019).

Blair J.M.A., Webber M.A., Baylay A.J., Ogbolu D.O., Piddock L.J.V.: Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nat. Rev. Microbiol. 42–51 (2015).

Calo J.R., Crandall P.G., O'Bryan C.A., Ricke S.C. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. Food Contr. 54, 111–119 (2015).

Cassella S., Cassella J.P., Smith I. Synergistic antifungal activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oils against dermatophyte infection. Int. J. Aromath. 12(1), 2-15 (2002).

Chanchal D., Swarnlata S. Novel approaches in herbal cosmetics. J. Cosmet. Dermat. 7, 89–95 (2008).

Chang S.T., Chen P.F., Chang S.C. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. J. Ethnopharmacol. 77, 123–127 (2001).

Doughari J.H., Ndakidemi P.A., Human I.S., Benade S.: Antioxidant, antimicrobial and antiverotoxic potentials of extracts of *Curtisia dentate*. J. Ethnopharmacol. 141, 1041–1050 (2012).

Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Microb. Infect. 5, 1213–1219 (2002).

Dzierżanowska D.: Antybiotykoterapia praktyczna. Wydawnictwo Medyczne, Polska, 2000.

Edris A.E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. Phytother. Res. 4, 308–323 (2007).

Elgayyar M., Draughon F.A., Golden D.A., Mount J.R. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. J. Food Prot. 7, 927–1084 (2001).

Gislene G.F.N.N., Locatelli J., Freitas P.C., Silva G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Braz. J. Microbiol. 31, 4, 247–256 (2000). <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822000000400003>

Guerra-Rosas M.I., Morales-Castro J., Ochoa-Martínez L.A., Salvia-Trujillo L., Martín-Belloso O.: Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. Food Hydrocoll. 52, 438–446 (2016).

Hall C.W., Hinz A.J., Gagnon L.B.P., Zhang L., Nadeau J.P., Copeland S., Saha B., Mah T.F. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Antibiotic Resistance Gene *ndvB* Expression Requires the RpoS Stationary-Phase Sigma Factor. Appl. Environ. Microbiol. 84, e02762-17 (2018).

He Z., Spain J.C. Studies of the Catabolic Pathway of Degradation of Nitrobenzene by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45: Removal of the Amino Group from 2-Aminomuconic Semialdehyde. Appl. Environ. Microbiol. 63, 4839-4843 (1997).

Hinneburg I., Dorman H.J.D., Hiltunen R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. Food Chem. 97, 122–129 (2006).

Hotchkiss R.D. The nature of the bactericidal action of surface active agents. The New York Academy of Sciences (1946). <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1946.tb36181.x>

Hyldgaard M., Mygind T., Meyer R.L., Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components, Front. Microbiol. 3, 12 (2012).

Khorshidian N., Yousefi M., Khanniri E., Mortazavian A.M., Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese, Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 45, 62–72 (2018).

Lai P., Rao H., Gao Y. Chemical composition, cytotoxic, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil from *Anthriscus caucalis* M. Bieb grown in China. Rec. Nat. Prod. 12, 290–294 (2018).

Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G.K.S., Wu Z., Paulsenk I.T., Reizer J., Saier M.H., Hancock R.E.W., Lory S., Olson M.V.: Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959–964 (2010).

Lee V.C. The Antibiotic Resistance Crisis. Part 1: Causes and Threats. *P&T* 40, 277–283 (2015).

Lewkowicz-Mosiej T. Black pepper. In: *Exotic Medicinal Plants*. Edit., T. Lewkowicz-Mosiej, 149–153, Wydawnictwo M, Kraków (2013).

López P., Sánchez C., Batlle R., Nerín C. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *J. Agr. Food Chem.* 57, 6939–6946 (2005).

Moraes-Lovison M., Marostegan L.F.P., Peres M.S., Menezes I. F., Ghiraldi M., Rodrigues R.A.F., Fernandes A.M., Pinho S.C. Nanoemulsions encapsulating oregano essential oil: Production, stability, antibacterial activity and incorporation in chicken pâté. *LWT* 233-240 (2017).

Mossel D.A.A., Westerdijk J. The physiology of microbial spoilage in foods. *Antonie van Leeuwenhoek* 15,1, 190-202 (1949).

Murray J.L., Kwon T., Marcotte E.M., Whiteley M. Intrinsic Antimicrobial Resistance Determinants in the Superbug *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 6, e01603-15 (2015).

Nair K.P.P. The agronomy and economy of black pepper (*Piper nigrum* L.) - The “King of Spices”. *Advances in Agronomy* 82, 271–389 (2004).

Nazzaro F., Fratianni F., De Martino L., Coppola R., De Feo V. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceutic.* 6, 1451–1474 (2013).

Ncube N.S., Afolayan A.J., Okoh A.I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *Afr. J. Biotechnol.* 7, 1797–1806 (2008).

Nguefack J., Budde B.B., Jakobsen M. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. *Lett. Appl. Microbiol.* 39, 395–400 (2004).

Paparella A., Taccogna L., Aguzzi I., Chaves-López C., Serio A., Marsilio, F., Suzzi G. Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Food Contr.* 19, 1174–1182 (2008).

Penfold A.R. Eucalyptus oils. *Environment : a magazine of science* 1(3) (1934).

Reilly J. Essential Oils and Medicinal Herbs: Suggested Industries for Ireland. *JSTOR* 22(87) (1933).

Silva F., Ferreira S., Queiroz J.A., Domingues F.C. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. *J. Med. Microbiol.* 60, 1479–1486 (2011).

Solórzano-Santos M., Miranda-Novales G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* 23(2), 136-141 (2012).

Waygood W.A. The naturally occurring flavours of foodstuffs. Analyst. 803 (1943).

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

a) Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Badania związane z moją pracą magisterską pod tytułem „Wykorzystanie wodnych emulsyjnych układów dwufazowych do mikroapsułkowania mikroorganizmów” realizowałam w latach 2007-2008 roku w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem dr Radosława Dembczyńskiego. Celem pracy było zbadanie wpływu procesu kapsułkowania w układach emulsyjnych typu ATPS (ang. *aqueous two-phase systems*) na przeżywalność bakterii probiotycznych *Lactobacillus rhamnosus*. Pierwszy etap polegał na opracowaniu odpowiednich proporcji polimerów wchodzących w skład emulsji, tak by powstała emulsja wykazywała się trwałością. Fazę rozproszoną stanowił dekstran, a rozpraszającą politlenek etylenu (PEG) lub poliwinylpirolidon (PVP). Po wysuszeniu (liofilizacyjnym i rozpyłowym) utworzone zostały kapsułki, w których bakterie gromadziły się w fazie z dekstranu (faza wewnętrzna emulsji). Drugi etap badań obejmował ocenę i porównanie stopnia przeżywalności bakterii w kapsułkach utworzonych poprzez suszenie rozpyłowe i liofilizacyjne (bezpośrednio po procesie kapsułkowania, jak również po 30. dniach przechowywania preparatów w warunkach chłodniczych oraz w temperaturze pokojowej). Okazało się, że na przeżywalność bakterii bezpośrednio po suszeniu wpływa przede wszystkim zastosowana substancja ochronna, a nie sama metoda suszenia. Po 30. dniach przechowywania utrwalaonych preparatów bakterii wyższy stopień przeżywalności bakterii odnotowano w przypadku emulsji utworzonych poprzez suszenie liofilizacyjne. Wykazano również, że temperatura przechowywania preparatów nie ma wpływu na przeżywalność bakterii *Lactobacillus rhamnosus* utrwalaonych za pomocą suszenia rozpyłowego i liofilizacji. Pracę magisterską obroniłam w maju 2008 roku. Rezultaty powyższych badań zostały opublikowane (zał. 3, pkt. II D, poz. 1).

Pozytywne wyniki wspomnianych wyżej badań oraz wola pogłębiania wiedzy i doskonalenia nabytych umiejętności związanych z pracą w laboratorium zachęciły mnie do rozpoczęcia studiów doktoranckich, które podjęłam w Ramach Dziennego Studium Doktoranckiego przy Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu w październiku 2008 roku. Tematyka, którą początkowo się zajmowałam wiązała się

z konwersją lignocelulozy z wycierki ziemniaczanej do bioetanolu II generacji. Badania te realizowane były w ramach projektu Biotechnologiczne przetwarzanie odpadów przemysłu ziemniaczanego (Projekt MNiSW N N312 311437). Byłam także wykonawcą tematu badawczego związanego z wymienioną powyżej tematyką, realizowanego w ramach badań własnych pt. „Opracowanie efektywnej metody obróbki wstępnej kompleksu lignocelulozowego ze słomy rzepakowej i wycierki ziemniaczanej” 1.01.2009-31.12.2009). Kierownikiem projektu była prof. dr hab. Grażyna Lewandowicz. Efektem podjętych badań są 3 publikacje (zał. 3, pkt. II D, poz. ; poz. 5; poz. 7). Jednocześnie zaangażowałam się w pomoc w realizacji prac magisterskich wykonywanych pod promotorstwem prof. dr hab. Grażyny Lewandowicz związanych z biodegradacją polimerów. Wynikiem badań były 2 publikacje (zał. 3, pkt. II A, poz. 2; zał. 3, pkt. II D, poz. 4). Realizując temat związany z produkcją bioetanolu, zaangażowałam się w prace polegające na ocenie zanieczyszczenia zbóż przeznaczonych do produkcji etanolu oraz problemu skażenia mikrobiologicznego samego procesu, czego efektem są kolejne publikacje (zał. 3, pkt. II A, poz. 1; zał. 3, pkt. II A, poz. 3; zał. 3, pkt. II D, poz. 2; zał. 3, pkt. II D, poz. 6).

Przeszkodę dla badań polegających na konwersji lignocelulozy z wycierki ziemniaczanej stanowił brak możliwości wystandaryzowania surowca, co powodowało problemy z opracowaniem metod efektywnej jego obróbki wstępnej, a także niska zawartość sacharydów, co przekładało się na małą efektywność procesu konwersji surowca do produktu.

W 2010 roku w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności rozpoczęto badania w ramach projektu Biotechnologiczna konwersja glicerolu do polioli i kwasów dikarboksylogowych PO IG 01.01.02-00-074/09. W projekcie tym wykonywałam analizy związane z mikrobiologiczną konwersją glicerolu do 1,3-propanodiolu, co stanowiło zarazem temat mojej rozprawy doktorskiej. Projekt miał charakter konsorcyjny i łączył wspólne prace naukowców z 5 instytucji naukowych w Polsce (Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Politechnika Poznańska). Zakres mojej pracy doktorskiej pt. „Charakterystyka aktywności metabolicznej *Clostridium bifermentans* zdolnych do syntezy 1,3-propanodiolu” obejmował wyizolowanie szczepów *Clostridium* spp. zdolnych do syntezy 1,3-propanodiolu z prób środowiskowych, identyfikację gatunków szczepów charakteryzujących się największą wydajnością syntezy 1,3-propanodiolu,

wyjaśnienie mechanizmów tolerancji badanych szczepów na obecność tlenu w środowisku hodowlanym, próby intensyfikacji produkcji 1,3-propanodiolu poprzez zmianę źródła węgla oraz modyfikację pH podłoża hodowlanego, a także oznaczenie pełnego profilu metabolicznego badanych mikroorganizmów i wyznaczenie hipotetycznych szlaków metabolicznych bakterii *Clostridium bifermentans*. Opracowana metoda izolacji bakterii z rodzaju *Clostridium* na zastosowanym podłożu oznaczonym jako PY (ang. *Pepton-Yeast*) wykazała się dużą selektywnością i umożliwiła pozyskanie wyłącznie bakterii z gatunku *C. bifermentans*. Czynnikiem różnicującym było podwyższone pH (8,66) podłoża. Ponadto, potwierdzono zdolność wyizolowanych szczepów bakterii *C. bifermentans* do syntezy 1,3-propanodiolu z glicerolu, co nie zostało wcześniej opisane. Wydajność syntezy 1,3-propanodiolu z glicerolu była na poziomie 9,12-14,94 g/l z 50g/l, a produktami ubocznymi tej konwersji były kwasy organiczne: octowy, bursztynowy, mrówkowy, mlekowy i etanol. Ważną obserwacją było to, że badane szczepy *C. bifermentans* posiadały zdolność do wzrostu i syntezy metabolitów w warunkach mikroaerofilnych. Poziom tlenu w środowisku hodowli poniżej 10% umożliwiał syntezę 1,3-propanodiolu na tym samym poziomie jak w warunkach beztlenowych. Analiza profilu białkowego wykazała obecność dysmutazy ponadtlenkowej w komórkach bakterii *C. bifermentans*. Podjęte próby intensyfikacji syntezy 1,3-propanodiolu, przez badane szczepy *C. bifermentans*, poprzez optymalizację składu podłoża hodowlanego, zmiany pH oraz źródła węgla w pożywce nie dały zadowalających rezultatów. Zmiana źródła węgla spowodowała całkowite zablokowanie syntezy 1,3-propanodiolu. Ustalono jednak, że badane szczepy wykazały zdolność do przeżycia w wysokim (13,0) i niskim pH (3,0). Ponadto wykazano zdolność do efektywnej syntezy kwasu mlekowego w warunkach różnych od optymalnych (przy pH obniżonym do ok 6). Efektem dogłębnych studiów literaturowych związanych z tematem biotechnologicznej konwersji glicerolu do 1,3-propanodiolu było opublikowanie 5. prac przeglądowych (zał. 3, pkt. II A, poz. 8; zał. 3, pkt. II A, poz. 5; zał. 3, pkt. II A, poz. 5; zał. 3, pkt. II D, poz. 10; zał. 3, pkt. II D, poz. 11) oraz rozdziału w książce (zał. 3, pkt. II E, pkt. 1).

Wyniki otrzymane podczas badań w zakresie pracy doktorskiej przedstawione natomiast zostały w 7. oryginalnych pracach (zał. 3, pkt. II A, poz. 7; zał. 3, pkt. II A, poz. 15; zał. 3, pkt. II A, poz. 18; zał. 3, pkt. II D, poz. 9; zał. 3, pkt. II D, poz. 13; zał. 3, pkt. II D, poz. 14; zał. 3, pkt. II

D, poz. 15) oraz w monografiach i doniesieniach konferencyjnych (zał. 3, pkt. III B, poz. 6-13, poster z poz. 8 został nagrodzony).

Rezultaty badań prowadzonych w trakcie pracy doktorskiej przedstawiłam także w wygłoszonych przeze mnie wykładach: *Clostridium bifermentans* – nietypowy przedstawiciel rodzaju *Clostridium*. Polskie Towarzystwo Mikrobiologów. 9 czerwca 2017 r. oraz Charakterystyka metaboliczna *Clostridium bifermentans*. I Plenarne Seminarium Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu. Zielonka, 22 czerwca 2017.

Powyzsza aktywność przyniosła mi w latach 2011-2014 następujące nagrody: zespołowe II stopnia (w latach 2011, 2013, 2014) i III stopnia (2012 rok) za oryginalne i twórcze osiągnięcia naukowe udokumentowane publikacjami.

Ponadto, byłam członkiem zespołu administrującego powyższym projektem. Praca ta polegała na opracowaniu i aktualizacji harmonogramu wydatków, konsultacjach z konsorcjantami, rozliczeniach oraz zdawaniu raportów z postępu prac.

Publiczna obrona mojej rozprawy doktorskiej, której promotorem była prof. dr hab. Katarzyna Czaczyk, odbyła się 4 lipca 2013 roku, a uchwałą Rady Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu 26 września 2013 roku otrzymałam stopień naukowy doktora nauk rolniczych w dyscyplinie biotechnologia. Na wniosek obu recenzentów moja rozprawa doktorska uzyskała wyróżnienie.

W trakcie studiów doktoranckich, odbyłam 2 staże zawodowe: staż w Poznańskich Zakładach Zielarskich „HERBAPOL” S.A. (6.02-30.03.2012) oraz staż w Pracowni Mikrobiologii w Laboratorium Badania Żywności i Przedmiotów Użytku w Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Poznaniu (kwiecień 2012). Staż w Herbapolu zachęcił mnie do podjęcia dalszych badań związanych z ekstraktami i olejkami eterycznymi.

b) Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam badania związane z biokonwersją glicerolu do 1,3-propanodiolu przez bakterie *C. bifermentans* oraz *C. butyricum*. Efektem tych badań jest współautorstwo 7 kolejnych publikacji podejmujących tę tematykę (zał. 3, pkt. II A, poz. 9-13; 16; 20) oraz rozdział w książce (zał. 3, pkt. II E, poz. 2). Za szczególnie ważną pracą, z naukowego punktu widzenia, uważam publikację, w której przedstawiono i porównano

szlaki metaboliczne glicerolu dla 3 nowo wyizolowanych szczepów: *C. bifermentans*, *Hafia alvei*, środowiskowy szczep *C. butyricum* (zał. 3, pkt. II A, poz. 16). Istotny jest fakt, że ani *C. bifermentans*, ani *H. alvei* nie były dotąd opisane w literaturze jako producenci 1,3-propanodiolu. Ponadto, w literaturze znaleźć można niespójne i nieliczne dane dotyczące zdolności *C. bifermentans* do utylizacji/konwersji glicerolu i nie ma żadnych informacji o takich uzdolnieniach metabolicznych u *H. alvei*.

Staż odbyty w firmie Herbapol skłonił mnie do podjęcia badań związanych z biotechnologicznym potencjałem olejków eterycznych, czego efektem jest współautorstwo w publikacjach (zał. 3, pkt. II A, poz. 14; 19 oraz 21). W 2016 roku brałam czynny udział w opracowaniu projektu pt. Molekularna charakterystyka sposobu hamowania procesu *quorum sensing* przez wybrane olejki eteryczne u *Pseudomonas* spp. wyizolowanych z żywności. Projekt NCN 2016/23/D/NZ9/0028. Byłam także wykonawcą zadania badawczego w powyższym projekcie. Prace naukowe napisane w efekcie badań związanych z tym tematem zostały przedstawione powyżej, jako osiągnięcie naukowe (zob. pkt 4). Dotyczą przeciwdrobnoustrojowej aktywności wybranych olejków eterycznych względem saprofitycznej bakterii *Pseudomonas orientalis*.

Obecnie, poza tematami odnoszącymi się do zagadnień z zakresu technologii żywności, podjęłam współpracę z Zakładem Anatomii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Dotychczasowe badania zostały opisane w 2 pracach będących na etapie recenzowania w czasopismach naukowych (*Ecomorphological adaptations of the White-tailed sea eagle <<Haliaeetus albicilla>> in light of the unique structure of its maxillary beak and nasal cavity* oraz *Pathomorphological changes and anomalies in occipital bone of the horse and their implications for horse welfare and training*). Efektem tych prac jest także projekt MINIATURA 3 pt. Właściwości keratyny ściany rogowej kopyta w świetle analiz cytometrycznych w odniesieniu do stanu anatomicznego narządu palcowego konia, którego jestem kierownikiem (czas realizacji styczeń 2020-styczeń 2021). Z kolei wyniki badań dotyczących różnic w morfologii komórek opuszki węchowej u zwierząt makrosmatycznych zostały zaprezentowane podczas konferencji *Cerebrum Cognita* w formie posteru pt. „Opuszka węchowa (*bulbus olfactorius*) wilka i psa – bioobrazowanie różnic morfologicznych komórek nerwowych” oraz wykładu pt. „Anatomia węchu wilka - czyli sekrety mózgu protoplasty psów”. Anatomiczne uwarunkowania zdolności węchowych ssaków stanowiły także temat

wyłoszonego przeze mnie wykładu pt. Czym pachnie świat, czyli analiza zmysłu powonienia z perspektywy człowieka i jego odwiecznego towarzysza psa, podczas konferencji Zwierzę i człowiek w jednym (nie) stali domu. Aporetyczności animalistyczne na przestrzeni dziejów w Warszawie.

6. Inne formy działalności naukowej

1) Recenzje

- Zrecenzowałam liczne manuskrypty dla krajowych i międzynarodowych czasopism naukowych (łącznie 70 prac) z tematyki związanej z biodegradacją polimerów, produkcją bioetanolu, biotechnologiczną syntezą 1,3-propanodiolu oraz przeciwdrobnoustrojowymi właściwościami roślinnych ekstraktów i olejków eterycznych.
- Byłam recenzentem 2 prac magisterskich oraz 7 prac inżynierskich realizowanych na Wydziałach Nauk o Żywności i Żywieniu oraz Rolnictwa i Bioinżynierii.

2) Od 2017 jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów.

3) Udział w konferencjach naukowych

Od początku mojej pracy naukowej do chwili obecnej jestem autorem 22 doniesień konferencyjnych, prezentowanych na kongresach krajowych i międzynarodowych (zał. 3, pkt. 3 B).

7. Działalność popularyzatorska

Jestem autorem 25 prac popularnonaukowych, m.in. z zakresu produkcji biopaliwa, biodegradacji polimerów, konwersji glicerolu do 1,3-propanodiolu, ochrony przyrody, zdrowego żywienia oraz przeciwdrobnoustrojowej aktywności olejków eterycznych.

1. Leja K. 2009. Dr Feliks Józef Krawiec (1906-1939). Wspomnienie w 70 rocznicę żołnierskiej śmierci. *Więści Akademickie*, 9-10 (132-133), 30-31.
2. Leja K., Lewandowicz G. 2009. Biopaliwa z biomasy lignocelulozowej. *Ekonatura*, 11(72), 20-21.
3. Broda M., Leja K. 2009. Zielona herbata i jej sekrety. *Ekonatura*, 12(73), 6-7.
4. Leja K., Broda M. 2009. Energia z wody. *Ekonatura*, 12(73), 25-26.
5. Leja K., Broda M. 2010. Biodegradowalne materiały opakowaniowe. *Ekonatura*, 1 (74), 19.
6. Broda M., Leja K. 2010. Czerwona herbata. *Ekonatura*, 4, 6-7.
7. Leja K., Czaczyk K., Grajek W. 2010. Zielona chemia – zagospodarowanie odpadowego glicerolu. *Ekonatura*, 6, 16-17.

8. Leja K., Broda M. 2010. Biodegradowalne materiały opakowaniowe. *Eko i My*, 2, 24-25.
9. Leja K. 2011. Produkcja bioetanolu z biomasy. Fermentacja etanolowa. *Ekonatura*. 2, 22-23.
10. Broda M., Leja K. 2011. Utylizacja odpadów komunalnych i przemysłowych - alternatywne surowce do produkcji bioetanolu. *Aura*. 3:11, 11-13.
11. Orczyk D., Leja K. Grajek W. 2013. Glicerol odpadowy - cenny surowiec o dużym potencjale przemysłowym. *Ekonatura*. 2, 33-33.
12. Samul D., Leja K. 2013. Sanos. *Ekonatura*. 9, 6.
13. Samul D., Leja K. 2013. Śluz ślimaka. *Ekonatura*. 11, 10.
14. Samul D., Leja K. 2013. Kranówka. *Ekonatura*, 12.
15. Leja K., Samul D. 2014. Czy bakterie z rodzaju *Clostridium* powinny być kojarzone wyłącznie z patogennością? *Ekonatura* 2/2014.
16. Suchomska D., Leja K. 2017. Przeciwdrobnoustrojowe działanie imbiru (*Zingiber officinale*). *Ekonatura* 9, 166, s. 7-9.
17. Szudera K., Leja K. 2017. Przeciwdrobnoustrojowe i przeciwutleniające działania szałwii (*Salvia officinalis*) i tymianku (*Thymus vulgaris* L.). *Ekonatura* 11(168), 6-8.
18. Szudera K., Leja K. 2017. Olejki eteryczne – charakterystyka i zastosowanie. 12(169), 7-8
19. Światała E., Leja K. 2018. Ocena jakości mikrobiologicznej suplementów diety. *Ekonatura* 1(170), 5-6
20. Szudera K., Leja K. 2018. Potencjał aplikacyjny olejków eterycznych część 1. Olejki o aromacie cytrusowym. *Ekonatura* 1(170), 9-10
21. Szudera K., Leja K. 2018. Potencjał aplikacyjny olejków eterycznych część 2. Olejki z roślin przyprawowych. *Ekonatura* 2(171), 5-7
22. Szudera K., Światała E., Leja K. 2018. Potencjał aplikacyjny olejków eterycznych część 3. Olejek z dziurawca zwyczajnego (*Hypericum perforatum* L.). *Ekonatura* 3(172), 10-11
23. Światała E., Szudera-Kończal K., Leja K. 2018. Nanocząstki w kosmetykach. *Ekonatura* 6(175), s.19
24. Szudera-Kończal K., Światała E., Leja K. (2018). Rośliny olejkowe w żywności, lekach i kosmetykach. *Ekonatura* 4, 173, 2018
25. Światała E., Szudera-Kończal K., Leja K. 2018. Najpopularniejsze substancje bioaktywne w olejkach eterycznych. *Ekonatura* 8(178), s. 5-6

Trzykrotnie, w latach 2011, 2014 oraz 2017 zostałam nagrodzona Laurem Ekoprzyjaźni za szerzenie wiedzy z zakresu ekologii.

8. Działalność dydaktyczna i organizacyjna

a) Działalność dydaktyczna

- a. Jestem promotorem 25 prac inżynierskich oraz 11 prac magisterskich, w tym 1 pisanej w języku angielskim. Pod moją opieką prace wykonywali studenci kierunków Technologia żywności i żywienie człowieka oraz Biotechnologia.
- b. Od 2014 roku biorę udział w zespole ds. przeprowadzania dyplomowych egzaminów inżynierskich dla kierunku biotechnologia.
- c. Prowadziłam staż studencki z zakresu mikrobiologii dla 2 studentów z kierunku Inżynieria Biotworzyw, Wydział Technologii Drewna (czerwiec-wrzesień 2017) oraz z kierunku Biotechnologia, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii (czerwiec-wrzesień 2018).
- d. Zajęcia dydaktyczne prowadzę od 2009 roku z przedmiotów: Mikrobiologia (Kierunek Zootechnika), Podstawy Mikrobiologii i Mikrobiologia Żywności (Kierunek Technologia Żywności i Żywienie Człowieka), Metody Biologiczne w Analizie Żywności oraz Fizykochemiczne i sensoryczne właściwości żywności (Kierunek Analityka Żywności), a także Mikrobiologia Przemysłowa, Biotechnologia Żywności, Biotechnologia w Farmacji i Kosmetyce oraz Ekologia stosowana dla studentów Biotechnologii.
- e. W latach 2010-2013 prowadziłam laboratoria po angielsku z przedmiotów: Basic Microbiology i Advanced Microbiology. Prowadzę wykłady po angielsku z przedmiotu Comprehension in Food Microbiology oraz wykłady po angielsku dla studentów Technologii Żywności w ramach przedmiotu Język Obcy.

b) Działalność organizacyjna

- a. Uczestniczyłam w organizacji sesji naukowej pt. „Postęp w wytwarzaniu i ocenie żywności” (październik 2009).
- b. Uczestniczyłam w organizacji i prowadzeniu zajęć podczas II, III, IV i V edycji Nocy Naukowców na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu (2010-2013).
- c. Opracowałam rozwiązania testów matury podstawowej oraz rozszerzonej z biologii dla Głosu Wielkopolskiego (2016).
- d. Od 2016 do 2019 roku byłam członkiem Rady Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Człowieka na UP.

- e. Przeprowadziłam zajęcia z mikrobiologii dla dzieci ze Szkoły Podstawowej w Rokietnicy, 6 lutego 2017.
- f. Przeprowadziłam zajęcia z mikrobiologii dla dzieci ze Szkoły Podstawowej w Kwilczu, 1 lutego 2018
- g. Przeprowadziłam zajęcia z mikrobiologii dla dzieci z Przedszkola Logicus w Rokietnicy w dniach: 12 lutego 2018, 13 czerwca 2018, 13 lutego 2019
- h. Zbierałam i opracowywałam dokumentację dot. nadawania stopnia dr hab. z biotechnologii, 2018
- i. Udzielam pomocy studentom Koła Naukowego Biotechnologii „Operon” w realizacji pierwszego etapu projektu WineUp, którego celem była izolacja drożdży z owoców winogron.
- j. Jestem członkiem Rady Programowej kierunku Biotechnologia i anglojęzycznego kierunku Biotechnologii (od 2019 roku).

9. Wskaźnik dokonań naukowych

Rodzaj aktywności	Przed doktoratem	Po doktoracie	Łącznie
Prace oryginalne w czasopismach uwzględnionych w bazie JCR	8	17	25
W tym jako pierwszy i/lub korespondencyjny autor	3	8	11
Prace przeglądowe w czasopismach uwzględnionych w bazie JCR	4	6	10
W tym jako pierwszy i/lub korespondencyjny autor	3	3	6
Prace nie uwzględnione w bazie JCR oryginalne	4	5	9
Prace nie uwzględnione w bazie JCR przeglądowe	5	4	9
Prace popularno-naukowe	14	11	25
Łączna liczba publikacji	78		
Wygłoszone referaty	1	5	6
Komunikaty posterowe na konferencjach	12	9	21
Rozdziały w książkach	1	1	2
Recenzje publikacji	20	50	70
Wypromowani dyplomanci (inżynieranci/magistranci)	0	25/11	36
Recenzje prac inżynierskich/magisterskich	0	7/2	9
Sumaryczny IF wg JCR w roku opublikowania pracy (w przel. Na 2018 rok)	30,121 (40,734)		
Sumaryczna punktacja wg MNiSW do roku 2018/od roku 2019	388/230		
Indeks Hirsh`a wg WoS	Luty 2020: 9		
Liczba cytowań wg WoS	Luty 2020: 429 (402 bez autocytowań)		
Indeks Hirsh`a wg bazy Scopus	10		
Liczba cytowań wg bazy Scopus	553 (527 bez autocytowań)		
Indeks Hirsh`a wg Google Scholar Citation	13		
Liczba cytowań wg Google scholar	944		

K. Sencisko - djc