



Kraków, dnia 21 sierpnia 2023 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pt. „**Monitoring szczepów *Listeria monocytogenes* w surowcach, produktach i środowisku zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego**”

autorstwa mgr inż. Martyny Zielińskiej-Tadych

Politechnika Bydgoska

Wydział Rolnictwa i Biotechnologii

MATERIAŁY OTRZYMANE W CELU DOKONANIA RECENZJI

W celu wykonania recenzji rozprawy doktorskiej przedstawiono następujące materiały:

1. Pismo w sprawie uchwały nr 32/2022/2023 Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich z dnia 29 czerwca 2023 roku.
2. Rozprawa doktorska pt. „Monitoring szczepów *Listeria monocytogenes* w surowcach, produktach i środowisku zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego” autorstwa mgr inż. Martyny Zielińskiej-Tadych.

1. Ocena problematyki badawczej

Podjęta tematyka badań w przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej mgr inż. Martyny Zielińskiej-Tadych, dotyczy ważnego zagadnienia, jakim jest kwestia bezpieczeństwa żywności. Jest ona przedmiotem szczególnej troski w skali globalnej, a więc dotyczy naszego kraju, Unii Europejskiej i pozostałych krajów świata. W ostatnich latach coraz częściej zwraca się uwagę na skutki zdrowotne wynikające z zagrożeń biologicznych występujących w żywności. Podkreśla się, że szczególnie żywność pochodzenia roślinnego, niepoddawana obróbce termicznej jest szczególnie narażona na skażenie mikrobiologiczne na każdym etapie łańcucha żywnościowego, w tym w zakładach przetwórstwa owocowo-warzywnego. W krajach europejskich, także w Polsce jako jedną z najgroźniejszych bakterii patogennych występujących w żywności wymienia się bakterie *Listeria monocytogenes*, która wywołuje infekcję, nazywaną listeriozą. Jest to choroba charakteryzująca się wysokim odsetkiem przypadków śmiertelnych, szczególnie wśród osób z grup ryzyka (m.in. noworodków i kobiet w ciąży). Jej szczególne właściwości adaptacyjne, takie jak oporność na krótkotrwałą pasteryzację, mrożenie, przeżywanie w warunkach chłodniczych, oporność na wiele środków dezynfekcyjnych i

możliwość wytwarzania biofilmu sprawiają, że może być obecna w różnych produktach żywnościowych i stanowić zagrożenie dla konsumentów. Istotną zatem rolę w zapewnieniu bezpieczeństwa żywności odgrywają badania monitoringowe, pozwalające na określenie występowania drobnoustrojów chorobotwórczych lub potencjalnie chorobotwórczych w żywności. Dlatego uważam, że praca doktorska mgr. inż. Martyny Zielińskiej-Tadych, pt. „Monitoring szczepów *Listeria monocytogenes* w surowcach, produktach i środowisku zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego” celnie wpisuje się w rozwiązywanie nakreślonego problemu oraz może przyczynić się do poprawy stanu środowiska produkcyjnego i żywności, a także zmniejszenia zagrożenia dla konsumentów.

2. Ocena pod względem formalnym i strukturalnym

Rozprawa doktorska została przygotowana i opracowana przez Panią mgr inż. Martynę Zielińską-Tadych na podstawie badań własnych wykonanych w Katedrze Mikrobiologii i Technologii Żywności Wydziału Rolnictwa i Biotechnologii Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy pod kierunkiem naukowym dr hab. Anny Ligockiej, prof. PBŚ - promotora oraz dr n. med. Katarzyny Grudlewskiej-Buda - promotora pomocniczego. Rozprawa posiada klasyczny układ, charakterystyczny dla prac doktorskich. Napisana jest w sposób usystematyzowany oraz jasnym i zrozumiałym językiem. Liczy 106 stron, w tym 30 tabel i 9 rysunków, 2 ryciny, które dobrze ilustrują omawiane zagadnienie i są niezbędne dla właściwej analizy tekstu rozprawy. Praca składa się z 8 rozdziałów, z 15 podrozdziałów 1 rzędu, 30 podrozdziałów 2 rzędu, 13 podrozdziałów 3 rzędu, co czyni pracę bardziej czytelną. Struktura rozdziałów jest prawidłowa i obejmuje wstęp, przegląd piśmiennictwa, cel badań, materiały i metody, wyniki badań, dyskusję, wnioski, literaturę oraz streszczenie. W bibliografii ujęto łącznie 206 pozycji, z których 27 to źródła internetowe. W przedstawionym w rozprawie piśmiennictwie przedmiotu, 80% stanowią prace w języku angielskim. W rozdziale pierwszym „Wstęp”, Autorka wprowadzając w zagadnienie informuje o problematyce zagrożeń dla zdrowia ludzkiego wynikających z obecności bakterii *Listeria monocytogenes* w produktach żywnościowych zarówno pochodzenia roślinnego, jak i zwierzęcego. Część teoretyczna rozprawy (przegląd piśmiennictwa) przedstawiona na 29 stronach jest przeglądem aktualnej wiedzy na temat: charakterystyki i występowania bakterii *Listeria monocytogenes* w środowisku i żywności, zdolności do tworzenia przez *Listeria monocytogenes* biofilmu, a także aktualnych metod służących do wykrywania *Listeria monocytogenes* oraz możliwości ograniczania ich rozwoju w żywności. Autorka w przeglądzie piśmiennictwa dała wyraz bardzo dobrej orientacji w obszernej literaturze przedmiotu. Z przedstawionej treści wstępnej części rozprawy wyłania

się także motywacja podjętych badań i cele pracy, które Autorka wraz z hipotezami badawczymi prezentuje w przejrzysty sposób na dwóch stronach rozprawy. Na kolejnych 18 stronach pracy, Autorka prezentuje materiał badawczy oraz szczegółowe rozwiązania metodyczne. Po nich na 18 stronach, Autorka bardzo precyzyjnie i w usystematyzowany sposób omawia uzyskane wyniki badań, a na kolejnych 6 umiejętnie konfrontuje uzyskane wyniki badań własnych z aktualnym stanem wiedzy, by w końcu rozprawy na 2 stronach zwięźle sformułować 10 wniosków. Rozprawa doktorska zakończona jest streszczeniem pracy w języku polskim i angielskim oraz obszernym piśmiennictwem przedmiotu, które zostało prawidłowo dobrane i w pełni wykorzystane w treści rozprawy.

Podsumowując, należy stwierdzić, że pod względem formalnym praca została wykonana poprawnie. Układ poszczególnych części rozprawy jest klasyczny i prawidłowy, ich objętość i merytoryczna zawartość odpowiada wymogom stawianym tego typu pracom.

3. Ocena merytoryczna rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa została przygotowana starannie i jest pracą oryginalną, wnoszącą nowe, interesujące elementy poznawcze, a uzyskane wyniki mają duże znaczenie aplikacyjne. Dowodzi dużej znajomości problemów badawczych poruszanych przez Autorkę i Jej przygotowania do prowadzenia samodzielnych badań. Mając na uwadze szeroki zakres przeprowadzonych badań i ich pracochłonność, warto docenić duży nakład pracy włożony przez Autorkę w ich realizację. Nadrzędnym celem rozprawy doktorskiej był monitoring zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego pod względem występowania pałeczek *Listeria monocytogenes* w próbkach środowiskowych zakładów, w surowcach i produktach oraz określenie cech fenotypowych i genotypowych bakterii. W oparciu o cel główny sformułowano 4 cele szczegółowe, których realizacja stała się przedmiotem badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy. Celami szczegółowymi były:

- a) wyizolowanie i określenie przynależności gatunkowej izolatów *Listeria* spp., oznaczenie ich serotypów oraz występowania genów kodujących wybrane czynniki wirulencji,
- b) określenie stopnia podobieństwa genetycznego pałeczek *Listeria monocytogenes*, celem określenia dróg transmisji bakterii na terenie zakładów przetwórczych,
- c) określenie zdolności szczepów do tworzenia biofilmu i ocena wpływu wybranych czynników antybakteryjnych na proces jego formowania i na eradykację błony biologicznej,
- d) ocena wrażliwości drobnoustrojów na wybrane czynniki antybakteryjne (nizyna, lizozym, bakteriofagi, środki dezynfekcyjne, antybiotyki).

Badania przeprowadzono na terenie dwóch zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego, położonych w województwie kujawsko-pomorskim. Próbkę pobierano w okresie

od marca do listopada 2019 roku. Materiał badawczy stanowiły próbki surowców (warzyw), produktów (mrożonek, soków i surówek) oraz wymazy z linii produkcyjnych. Próbki pochodzące ze środowiska zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego pobierano z miejsc mających bezpośredni kontakt z żywnością (np. taśma produkcyjna, dysza dozująca itp.) oraz miejsc niemających kontaktu z żywnością (np. kratki odpływowe, posadzki itp.). Celem poznania źródeł zakażeń lub dróg transmisji pobierano również wymazy z odzieży roboczej pracowników i śluz dezynfekcyjnych, przez które pracownicy dostają się na teren zakładu. Praca została zaplanowana w sposób staranny i logiczny, wykonana na obszernym materiale przy zastosowaniu nowoczesnej metodyki, co wynika zapewne z dobrego opanowania warsztatu badawczego przez Autorkę. Warstwa metodologiczna rozprawy, w aspekcie preparatyki laboratoryjnej wskazuje, że Autorka biegle porusza się zarówno w obszarze technik klasycznych powszechnie stosowanych w badaniach mikrobiologicznych jak i nowoczesnych metod molekularnych opartych na amplifikacji PCR wyizolowanego genomowego DNA (RAPD). Przyjęta koncepcja realizacji badań i zaplanowany sposób ich prowadzenia w pełni odpowiadają problemom zdefiniowanym w celu prowadzenia badań. Zakres przeprowadzonych analiz dostosowanych do celu pracy, przy zastosowaniu właściwej metodyki, a także wnikliwa interpretacja otrzymanych wyników umożliwiają właściwą weryfikację sformułowanych na wstępie hipotez badawczych i nie budzą zastrzeżeń ani od strony metodycznej ani merytorycznej. W rezultacie przeprowadzonych badań Autorka uzyskała wiele oryginalnych i nowych dla nauki wyników. Rozdział „Wyniki”, zawiera dużą ilość kompletnych danych, które zaprezentowane zostały w sposób poprawny, syntetyczny i przejrzysty oraz opracowano je właściwie dobranymi metodami statystycznymi. Zamieszczone w pracy liczne tabele i rysunki zostały wykonane starannie, stanowią właściwą dokumentację i dobrze ilustrują omawiane zagadnienie.

Wśród uzyskanych rezultatów na szczególne podkreślenie zasługuje:

- a) identyfikacja bakterii z rodzaju *Listeria* przy użyciu metod hodowlanych i następnie poddanie ich analizie molekularnej w celu potwierdzenia przynależności do gatunku *Listeria monocytogenes*, co pozwala na precyzyjną kontrolę rozprzestrzeniania się tego gatunku bakterii w środowisku badanych zakładów i ewentualną korektę występujących w tym zakresie zjawisk niepożądanych;
- b) określenie stopnia podobieństwa genetycznego pałeczek *Listeria monocytogenes* - w tym zakresie wskazano, że potencjalną drogą transmisji pałeczek *L. monocytogenes* na teren zakładu są świeże surowce, skąd bakterie trafiają na powierzchnie i elementy linii technologicznych przyczyniając się do skażenia gotowych produktów;
- c) ocena zdolności szczepów *Listeria monocytogenes* do tworzenia biofilmu bakteryjnego i wpływ różnych czynników na ten proces poszczególnych badanych zakładów pracy – spostrzeżenie, że ponad 46% badanych szczepów charakteryzowało się silną i bardzo silną

zdolnością do tworzenia biofilmu oraz, że antybakteryjne czynniki biologiczne (lizozym, nizyna, fagi) ograniczały powstawanie tej struktury i eliminowały już istniejącą błonę biologiczną. Jest to niezwykle ważny wniosek praktyczny z punktu widzenia zabezpieczenia żywności przed ryzykiem wtórnego jej skażenia;

- d) ocena antybiotykooporności szczepów *Listeria monocytogenes* na wybrane czynniki antybakteryjne – co jest bardzo ważnym aspektem przy nasilającym się zjawisku lekoodporności bakterii, powodującym wzrost zagrożenia niebezpiecznymi zakażeniami i utrudniającym terapię.

Wysoko należy również ocenić rozdział „Dyskusja”, który jest napisany w sposób pozwalający na łatwe zorientowanie się w uzyskanych wynikach. Autorka umiejętnie prezentuje je na tle rezultatów dotychczasowych badań przeprowadzonych przez innych autorów, co niewątpliwie podnosi wartość rozprawy doktorskiej. Sposób przeprowadzenia dyskusji świadczy o dużej wiedzy i dojrzałości Autorki. W oparciu o uzyskane wyniki Autorka poprawnie sformułowała wnioski, które obejmują zakres wykonanych badań. W syntetyczny sposób uogólniają prezentowane wyniki i są w pełni uzasadnione. Potwierdzają, że:

- a) w monitorowanych zakładach przetwórstwa owocowo-warzywnego występowały bakterie *Listeria monocytogenes*. Najczęściej były izolowane z mrożonych produktów, natomiast najrzadziej z wymazów z elementów i powierzchni niemających bezpośredniego kontaktu z przetwarzaną żywnością;
- b) potencjalną drogą transmisji bakterii *Listeria monocytogenes* na teren zakładu były świeże surowce, skąd trafiały na powierzchnie i elementy linii technologicznych przyczyniając się do skażenia gotowych produktów;
- c) w znacznym stopniu badane szczepy wykazywały zdolność do tworzenia biofilmu;
- d) ponad 30% szczepów charakteryzowało się opornością na wybrane antybiotyki;
- e) zastosowane w zakładach zabiegi czyszczenia i dezynfekcji okazały się niewystarczające, aby skutecznie ograniczyć transmisję *Listeria monocytogenes*.

Na tle zaprezentowanej powyżej opinii można stwierdzić, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Martyny Zielińskiej-Tadych reprezentuje wysoką wartość naukową, poznawczą i aplikacyjną.

Z obowiązku recenzenta powyższej rozprawy doktorskiej, muszę jednak w tym miejscu przedstawić pewne drobne uwagi dotyczące pracy:

- w rozdziale „Materiały i metody” należało zamieścić charakterystykę wytypowanych do badań zakładów oraz podać, jaka była liczba pobranych próbek w poszczególnych zakładach;
- w opisie metodyki badań Autorka podaje, że materiał badawczy stanowiły próbki surowców i produktów, pobierane na terenie dwóch zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego. Czytelnik chętnie dowiedziałby się, bardziej szczegółowo, na jakim etapie linii technologicznej były one pobierane, w jakiej ilości;

- czytelnik chętnie zapoznałby się już w opisie metodyki badań a nie dopiero w rozdziale „Wyniki” z informacją, jakiego rodzaju próbki surowców i produktów były pobrane do badań oraz jaką liczbę stanowiły w łącznej sumie zgromadzonych próbek;
- w opisie metodyki badań Autorka podaje, że „próbki pobierano w okresie od marca do lipca (zakład A) oraz od lipca do listopada (zakład B) 2019 roku”, natomiast w rozdziale „Wyniki” Autorka informuje, że „W okresie od czerwca do listopada 2019r. pobrano łącznie 320 próbek z dwóch zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego” - należy ujednoczyć opis.

W trakcie lektury rozprawy znalazłem niewielką liczbę błędów drukarskich lub drobnych niejasności, które przytoczę;

- proszę usunąć w spisie treści i na stronie 26 „w” przed „*L. monocytogenes*...”;
- powinno być „Jest także w stanie przetrwać...” zamiast „Jest także jest w stanie przetrwać” (str. 13);
- proszę „*L. monocytogenes*” pisać kursywą (str. 17);
- proszę usunąć „oraz” po wyrazie „gospodarza” (str. 17);
- proponuję „Na szczególnie ciężki przebieg choroby szczególnie narażone są osoby ... czy będących po przeszczepie...” zastąpić „Na ciężki przebieg choroby szczególnie narażone są osoby czy będące po przeszczepie...”(str. 18);
- proponuję „we wodzie i glebie” zastąpić „w wodzie i glebie” (str. 19);
- powinno być „stosowano” zamiast „stosowany” (str. 20);
- proponuję „skażeń kolejno” zastąpić „następujących skażeń” (str. 24);
- powinno być „wpływających na zagrożenie bezpieczeństwa” zamiast „wpływających zagrożenie bezpieczeństwa” (str. 25);
- proszę zastąpić „przeznaczonych produkcji” przez „przeznaczonych do produkcji” (str. 26);
- proponuję zastąpić „ml” przez „cm³” (str. 28);
- brak dwukropka po słowie „składzie” (str. 34);
- dobrze byłoby przereklamować zdanie „Do powszechnie stosowanych klasycznych metod...”(str. 34);
- powinno być „kilku” zamiast „kilki” (str. 38);
- proszę zastąpić „...się klasycznej metodzie” przez „...się na klasycznej metodzie”(str. 38);
- powinno być „prawie czarne” zamiast „prawie czarnym” (str. 55);
- powinno być „określono” zamiast „określona” (str. 55);
- proponuję zastąpić „...testu ANOVA i testu Post-Hoc Tukeya” przez „...analizy wariancji (ANOVA), a istotność różnic pomiędzy średnimi weryfikowano testem Tukey’a” (str. 61);
- należy skorygować „tabela 35” w opisie wyników (nieprawidłowa numeracja) (str. 78);
- powinno być „były środki” zamiast „był środki” (str. 85).

Jako recenzent, pragnę w tym miejscu podkreślić, że powyższe uwagi edycyjne dotyczą drugoplanowych szczegółów, które w żadnym razie nie obniżają bardzo wysokiej oceny recenzowanej rozprawy doktorskiej, którą oceniam bardzo pozytywnie. Wartość poznawcza rozprawy jest duża, a staranność realizacji podjętych zamierzeń w warstwie badawczej wysoka.

W świetle przedstawionej pracy nasunęły mi się również pewne pytania, na które chciałbym uzyskać odpowiedź:

- co sądzi Autorka na temat stosowania aktualnych metod kontroli występowania bakterii *Listeria monocytogenes* w zakładach przetwórstwa owocowo-warzywnego i czy należałoby wdrożyć dodatkowe metody kontroli ich występowania w żywności?
- jaka mogła być przyczyna, że zastosowane w zakładach zabiegi czyszczenia i dezynfekcji okazały się niewystarczające, aby skutecznie ograniczyć transmisję *Listeria monocytogenes*?

4. Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę powyższe dane dotyczące oceny formalnej i merytorycznej rozprawy doktorskiej mgr inż. Martynty Zielińskiej-Tadych, pt. „Monitoring szczepów *Listeria monocytogenes* w surowcach, produktach i środowisku zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego” stwierdzam, że powyższa rozprawa doktorska jest pozycją bardzo wartościową i stanowiącą znaczący, oryginalny wkład do nauki. Rozprawa doktorska potwierdza, że Autorka opanowała nowoczesne metody prowadzenia badań naukowych oraz posiadała umiejętność interpretacji i dyskusji wyników. W świetle powyższych danych uważam, że rozprawa doktorska wykona przez mgr inż. Martynę Zielińską-Tadych odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim przez ustawę z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). W związku z powyższym wnioskuję o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Martynty Zielińskiej-Tadych do dalszych etapów postępowania przewodu doktorskiego. Równocześnie ze względu na wysoki poziom naukowy i znaczenie tematyki badawczej stawiam wniosek o wyróżnienie powyższej rozprawy.



dr hab. inż. Krzysztof Frączek, prof. URK
Katedra Mikrobiologii i Biomonitoringu
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie