



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

ul. Wojska Polskiego 28

60-637 Poznań

tel. +48 61 848 77 26

e-mail: kiwis@up.poznan.pl

WYDZIAŁ INŻYNIERII ŚRODOWISKA

I INŻYNIERII MECHANICZNEJ

Katedra Inżynierii Wodnej i Sanitarnej

prof. UPP dr hab. inż. Agnieszka Pilarska

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Wydział Inżynierii Środowiska i Inżynierii Mechanicznej

Katedra Inżynierii Wodnej i Sanitarnej

ul. Piątkowska 94A, 60-649 Poznań

Tel. (061) 846-65-93, e-mail: agnieszka.pilarska@up.poznan.pl

Poznań, 31.08.2023 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Martyny Zielińskiej-Tadych

zatytułowanej

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

Promotor

dr hab. Anna Ligocka, prof. PBŚ

Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

Promotor Pomocniczy

dr n. med. Katarzyna Grudlewska-Buda

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

1. Podstawa opracowania recenzji

Recenzję opracowano na podstawie zlecenia Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny *rolnictwo i ogrodnictwo* Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich, prof. dr hab. inż. Mirosława Kobierskiego, z dnia 4 lipca 2023 roku (nr pisma WRiB.530.6.2019.16.2023). Podstawę formalno-prawną opracowania recenzji rozprawy doktorskiej mgr inż. Martyny Zielińskiej-Tadych pt.: „Monitoring szczepów *Listeria monocytogenes* w surowcach, produktach i środowisku zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego” stanowi Uchwała nr 32/2022/2023 Rady Naukowej Dyscypliny *rolnictwo i ogrodnictwo* Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich z dnia 29 czerwca 2023 roku.

2. Tematyka rozprawy doktorskiej

Bakterie z rodzaju *Listeria* występują w przyrodzie powszechnie. Szerokie spektrum ich tolerancji na czynniki fizykochemiczne sprawia, że są w środowisku wszechobecne. Kontakt człowieka z w/w bakteriami może następować za pośrednictwem gleby, wody, ścieków, odchodów zwierząt czy zanieczyszczonych roślin. Spośród kilkunastu gatunków, największe zagrożenie dla człowieka stanowią pałeczki *L. monocytogenes*, zdolne do pokonywania trzech głównych barier w ludzkim organizmie: bariery jelitowej, bariery łożyskowej i bariery krew – mózg. Obecność tego gatunku stwierdza się m.in. w mleku i produktach mlecznych, mięsie i produktach mięsnych oraz warzywnych. Według danych RASFF (ang. *Rapid Alert System for Food and Feed*, Krajowy System Wczesnego Ostrzegania Niebezpiecznej Żywności) z 2017 roku, gatunek ten był drugim, pod względem częstotliwości występowania, patogenem

obecnym w żywności przetworzonej. Spożycie żywności zawierającej *L. monocytogenes* niesie poważne ryzyko wystąpienia listeriozy, zapalenia żołądka i jelit, zapalenia opon mózgowych, posocznicy, a także wewnątrzmacicznych infekcji u ciężarnych kobiet czy poronień. Listerioza została uznana za najbardziej śmiertelną chorobę odżywnościową wywołaną przez patogeny jelitowe (śmiertelność 30%). Co więcej, w ostatnich latach liczba zakażeń na listeriozę, skutkiem spożycia żywności skażonej *L. monocytogenes*, sukcesywnie rośnie. Tendencji niniejszej sprzyja wzrost zainteresowania konsumentów żywnością typu RTE (gotowej do spożycia), a także niewłaściwie przygotowywanie lub przechowywanie żywności.

Bezpieczeństwo żywności jest obecnie jednym z najważniejszych obszarów mających wpływ na zdrowie i życie człowieka. Jego zapewnienie wymaga kontroli w całym cyklu produkcyjnym. Począwszy od surowca, poprzez linie technologiczne, aż do gotowego produktu należy dążyć się do ograniczenia ryzyka mikrobiologicznego skażenia. Przedstawione informacje potwierdzają konieczność monitorowania obecności *L. monocytogenes* na każdym etapie produkcji artykułów spożywczych. Obecnie, wyeliminowanie pałeczek z łańcucha żywieniowego stanowi ogromne wyzwanie zarówno dla praktyków, jak i badaczy. **Podjęcie zatem przez Autorkę rozprawy tematu związanego z monitoringiem szczepów *Listeria monocytogenes* w surowcach, produktach i środowisku zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego, uważam za wysoce uzasadnione.**

3. Ogólna charakterystyka i ocena formalna rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została napisana na Wydziale Rolnictwa i Biotechnologii Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich przez mgr inż. Martynę Zielińską-Tadych. Promotorem niniejszej rozprawy jest dr hab. Anna Ligocka, prof. PBS, natomiast promotorem pomocniczym dr n. med. Katarzyna Grudlewska-Buda.

Celem głównym ocenianej pracy była realizacja monitoringu zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego pod kątem występowania pałeczek *Listeria monocytogenes*. Badaniom poddane zostały próbki środowiskowe z dwóch zakładów, a także surowce i produkty. Próbki w znacznej ilości pochodziły z wymazów linii technologicznych, elementów i powierzchni niemających bezpośrednio kontaktu z przetwarzaną żywnością oraz świeżych surowców i produktów. Najmniejszą ilość stanowiły próbki z produktów mrożonych. Pobierany materiał badano pod względem fenotypowych i genotypowych cech bakterii, co pośrednio miało wpłynąć na poprawę stanu środowiska produkcyjnego i żywności, a tym samym na zmniejszenie ryzyka zachorowania konsumentów.

W pracy postawiono pięć hipotez badawczych o następującej treści:

H1: Zarówno surowce, produkty, jak i środowisko zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego są miejscami bytowania bakterii *Listeria monocytogenes*.

H2: Potencjalnym źródłem transmisji bakterii na terenie zakładów przetwórczych są surowce i pracownicy.

H3: Bakterie wykazują zdolność do tworzenia biofilmu, a zastosowane środki antymikrobiologiczne ograniczają powstanie tej struktury oraz eliminują wytworzony biofilm.

H4: Bakterie są wrażliwe na środki dezynfekcyjne stosowane w zakładach przetwórczych, antybiotyki i biologiczne czynniki antybakteryjne.

H5: Większość wyizolowanych bakterii należy do serotypów najczęściej wywołujących listeriozę i posiada geny zlokalizowane na głównych wyspach patogeniczności.

Próbki pobrane w określonym w pracy przedziale czasowym (w łącznej ilości 320) poddano sekwencji odpowiednich analiz. W pierwszej kolejności wyizolowano i określono przynależność gatunkową izolatów *Listeria* spp. Wykonano oznaczenie ich serotypów oraz występowania genów kodujących wybrane czynniki wirulencji. Celem wskazania dróg transmisji bakterii na terenie monitorowanych zakładów przetwórczych, określono również stopień podobieństwa genetycznego izolatów. Następnie przeprowadzono ocenę wrażliwości drobnoustrojów na wybrane czynniki antybakteryjne, w tym nizinę, lizozym, bakteriofagi.



W ramach prac badawczych określono również zdolności szczepów do tworzenia biofilmu oraz zweryfikowano wpływ czynników antybakteryjnych na proces jego formowania i eradykację błony biologicznej. W podsumowaniu badań przeprowadzono ocenę antybiotykoodporności szczepów *L. monocytogenes* oraz weryfikację wpływu wybranych środków dezynfekcyjnych, mających skutecznie ograniczać rozwój i transmisję bakterii.

Przyjęty tok prac badawczych oceniam jako logiczny i właściwie zaplanowany. Autorka pracy konsekwentnie dążyła do uzyskania pełnych odpowiedzi dla sformułowanych hipotez. Postępowanie niniejsze stworzyło możliwość poszerzenia zarówno praktycznych, jak i naukowych zasobów informacji w podjętym temacie.

W pracy przedstawiono szczegółowy wykaz i skład wykorzystanych podłoży hodowlanych, odczynników, sprzętu laboratoryjnego, oprogramowania komputerowego, jak również stosowanych technik i procedur. **O bardzo dobrym warsztacie badawczym** mgr inż. Martyny Zielińskiej-Tadych świadczy znaczne i umiejętne wykorzystanie w pracy, obok klasycznych metod mikrobiologicznych, nowoczesnych **metod biologii molekularnej**.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca zawiera wszystkie wymagane elementy rozprawy doktorskiej oraz ma charakter naukowo-badawczy.

4. Zawartość rozprawy doktorskiej i ocena merytoryczna

Rozprawa doktorska mgr inż. Martyny Zielińskiej-Tadych została wydana w formie monografii i liczy 106 ponumerowanych stron dwustronnie zadrukowanych i oprawionych. Zawiera tekst zasadniczy z 4 fotografiami, 2 rycinami, 9 rysunkami i 30 tabelami, składający się ze Wstępu (oznaczonego jako rozdział 1) oraz 6 głównych rozdziałów (Przegląd piśmiennictwa, Cele pracy i hipotezy badawcze, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, zajmujących 87 stron. Dodatkowo przedstawiona do recenzji dysertacja zawiera spis 206 pozycji biograficznych mieszczący się na 15 stronach, a także streszczenie w języku polskim i angielskim (4 strony). Układ pracy jest prawidłowy, z zachowaniem właściwych proporcji poszczególnych rozdziałów oraz **zgodny z ogólnie przyjętymi, dla tego typu prac naukowych, zasadami**. Przydatnym w interpretacji wyników oraz w studiowaniu pozostałych rozdziałów byłby **wykaz oznaczeń i skrótów z objaśnieniami**, zamieszczony na początku pracy. Dobrze jednak, że objaśnienia te znalazły swoje miejsce w tekście (choć nie wszystkie) oraz pod odpowiednimi tabelami. Warto było również (choć nie jest to kwestia obligatoryjna), wprowadzić **wykaz fotografii, rycin, rysunków i tabel**.

Rozdział 1. WSTĘP (s. 11-12) W tej części pracy Doktorantka scharakteryzowała następstwa związane z występowaniem bakterii z rodzaju *Listeria* w przyrodzie i ich potencjalnym wpływem na zdrowie człowieka. Ponadto wskazała środowisko ich bytowania, podkreślając niebezpieczeństwo wynikające z obecności pałeczek *L. monocytogenes* w artykułach spożywczych. **Poprzez informacje zawarte we wstępie Autorka rozprawy udowodniła zasadność realizacji badań** w kierunku wykrywania i eradykacji *Listeria* spp., ze szczególnym uwzględnieniem *L. monocytogenes* oraz konieczność ich monitorowania. Wskazała również, że nowoczesne metody molekularne oraz serologiczne są szybsze, bardziej czułe i specyficzne w wykrywaniu bakterii chorobotwórczych w przetworzonej żywności, w porównaniu metodami klasycznymi.

Rozdział 2. Stanowi PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA (s. 13-41) odnoszący się do podstaw literaturowych rozważanych w rozprawie doktorskiej aspektów. Omawiana część pracy została podzielona na cztery rozdziały główne, w większości (poza najkrótszym trzecim rozdziałem) zawierające, obok tekstu wprowadzającego, treść uporządkowaną w odpowiednich podrozdziałach. Wprowadzony przez Autorkę podział omawianych zagadnień **logicznie i poprawnie organizuje treść**, w myśl zasady „od ogółu do szczegółu”, tworząc jasny ciąg myślowy. Przegląd piśmiennictwa oparto w znacznej mierze na zagranicznych doniesieniach

literaturowych, w większości pochodzących z ostatniej dekady. **Niewątpliwą jego zaletą** są ujęte przez Doktorantkę liczne **szczegółowe i praktyczne informacje z zakresu zagadnień związanych z rozprawą**. Należy podkreślić również, że analizowany rozdział pracy doktorskiej, podobnie, jak pozostała jej część został napisany staranną, poprawną polszczyzną, z zachowaniem zasad interpunkcji. **Stosowana nomenklatura, obowiązująca w obszarze podjętej tematyki badawczej, jest prawidłowa.**

Filarami przeglądu piśmiennictwa, opracowanego przez Panią mgr inż. Zielińską-Tadych, są następujące rozdziały: Charakterystyka *Listeria monocytogenes*, Występowanie *L. monocytogenes* w środowisku i żywności, Metody zwalczania biofilmu, Metody wykrywania *Listeria monocytogenes* w środowisku produkcyjnym żywności, zawierające między innymi szczegółowe informacje dotyczące bakterii *L. monocytogenes*. Autorka pracy opisuje środowisko życia w/w bakterii, charakteryzuje jej szczególną zdolność do przetrwania i namnażania. Wskazuje, że *L. monocytogenes*, jako organizm psychrotolerancyjny, stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego i przemysłu. Kluczowym w tej kwestii pozostaje fakt, że przechowywanie żywności w warunkach chłodniczych oraz jej mrożenie, będące najbardziej powszechnymi metodami konserwowania, nie stanowią skutecznej bariery, eliminującej analizowany patogen z żywności. W poszczególnych podrozdziałach przedstawione zostały informacje związane z genotypem i serotypami bakterii z gatunku *Listeria monocytogenes*, mechanizmami wirulencji *L. monocytogenes*, co jest bardzo istotne, ponieważ badana bakteria jest zdolna do pokonywania trzech głównych barier w ludzkim organizmie i może wnikać do różnego typu komórek nefagocytujących oraz przemieszczać się w tkankach. Na kolejnych kartach pracy doktorskiej zaprezentowane zostały informacje dotyczące m.in. zagadnień związanych z: występowaniem *L. monocytogenes* w środowisku i żywności, metodami zwalczania biofilmu oraz metodami wykrywania *L. monocytogenes* w środowisku produkcyjnym żywności. **Za szczególnie wartościową część przeglądu piśmiennictwa uważam omówienie metod ograniczania rozwoju *L. monocytogenes* w żywności pochodzenia roślinnego oraz środowisku produkcyjnym żywności.** W pierwszej kolejności Doktorantka opisała klasyczne metody mikrobiologiczne (metody hodowlane), które pomimo niewątpliwiej czaso- i pracochłonności pozostają metodami pierwszego wyboru. Następnie przedstawiła molekularne metody, które zapewniając najwyższy stopień precyzji, z roku na rok zyskują coraz większe zainteresowanie wśród badaczy i, jak podkreśliła Autorka, coraz częściej uzyskują certyfikaty walidacji, stając się alternatywą dla metod konwencjonalnych. Wśród metod molekularnych, w kolejnych podrozdziałach, krótko scharakteryzowano: metody oparte na amplifikacji DNA, Multiplex PCR, Real-Time PCR (PCR w czasie rzeczywistym), RT-PCR (ang. *Reverse Transcription-PCR*), NASBA (ang. *Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*), LAMP, (ang. *Loop Mediated Isothermal Amplification*) oraz wykrywanie polimorfizmu pojedynczych nici DNA. Autorka rozprawy nie omieszkła wspomnieć również o metodach hybrydacyjnych i szybkich testach. **Rozdział trzeci przeglądu piśmiennictwa**, czyli metody zwalczania biofilmu, jest zdecydowanie najuboższym w treść, a zarazem dane literaturowe. **W tej części brakuje odniesień literaturowych** do fragmentów tego wymagających, przykładowo: „Udowodniono, że eliminacja biofilmu *L. monocytogenes* najłatwiejsza jest.....[?]”. **Niektóre fragmenty tego rozdziału należałoby uzupełnić** o merytoryczne wyjaśnienia (z podaniem źródła), np.: „Jednakże niektóre związki chemiczne stymulują rozwój oporności drobnoustrojów, dlatego nadal poszukuje się naturalnych środków antymikrobiologicznych...”. W omawianym rozdziale, w mojej opinii brakuje również bezpośredniego nawiązania do aktualnie prowadzonych badań nad metodami zwalczania biofilmu (za wyjątkiem lakonicznej wzmianki w ostatnim zdaniu).

Za nieco słabszą stronę przeglądu piśmiennictwa omawianej rozprawy doktorskiej, zobligowana jestem wskazać również znikomą ilość schematów czy rysunków obrazujących omawiane czynniki i zależności. Rysunek 1 („Czynniki wpływające na skażenie surowców roślinnych *L. monocytogenes* [Miceli i Setani, 2019]”) byłby znakomitą formą przekazu



kluczowych dla podjętego problemu informacji, lecz jego słaba czytelność/jakość znacznie utrudnia interpretację. **Z drugiej jednak strony, wysoko oceniam** opracowane przez Doktorantkę liczne i czytelne tabele, które właściwie porządkują informacje we fragmentach tego wymagających.

Reasumując, Autorka rozprawy dokonała krytycznego i szerokiego przeglądu literatury w podjętym temacie, co potwierdza Jej znaczącą i ugruntowaną wiedzę, a także świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu do realizacji przyjętych celów badawczych.

Rozdział 3. (s. 42-43) dotyczy sformułowania CELÓW PRACY I HIPOTEZ BADAWCZYCH. W rozdziale niniejszym przedstawiony został cel główny, cztery cele szczegółowe oraz pięć hipotez badawczych, które zostały potwierdzone w wyniku przeprowadzonych w ramach pracy badań. Ta decydująca o prawidłowej i skutecznej realizacji pracy badawczej część dysertacji, została omówiona wcześniej, w pkt 3 recenzji. Nawiązując do mojej pozytywnej opinii, uznaję sformułowanie celu głównego oraz celów szczegółowych rozprawy za poprawne, a postawione hipotezy za adekwatne zarówno do podjętego tematu pracy doktorskiej, jak i ustalonych celów.

Rozdział 4. (s. 44-61) przedstawia MATERIAŁY I METODY, jako dwa kolejne rozdziały wskazanej części pracy. Metodyka pracy została przedstawiona w sposób prawidłowy i klarowny, zgodnie z obowiązującymi zasadami metodologii badań naukowych.

Materiał badawczy stanowiły próbki surowców (warzyw), produktów (mrożonek, soków i surówek) oraz wymazy z linii produkcyjnych, pobierane na terenie dwóch zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego, położonych w województwie kujawsko-pomorskim. Próbkę pobierano w okresie od marca do lipca (zakład A) oraz od lipca do listopada (zakład B) 2019 roku. Łącznie zgromadzono 320 próbek, w których stwierdzono obecność bakterii z rodzaju *Listeria*. Szczepem wzorcowym wykorzystanym przez Doktorantkę do analiz mikrobiologicznych z zastosowaniem metod dPCR (identyfikacja rodzajowa i gatunkowa bakterii z rodzaju *Listeria*) oraz RAPD (ocena podobieństwa genetycznego izolatów *L. monocytogenes*) był *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644™ (ang. *American Type Culture Collection*). Kontrolę dodatnią reakcji PCR w ocenie potencjału wirulencji stanowił DNA szczepu *L. monocytogenes* IW 41 z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów. Szczepy wzorcowe w badaniu serotypów izolatów bakteryjnych stanowiły szczepy CIP104794, CIP105449, CIP105448 oraz CIP78.38 (ang. *Collection of the Institut Pasteur*). Autorka pracy wykonała namnożenia i wstępną identyfikację szczepów *Listeria* spp. W tym celu zostały wykorzystane zostały podłoża rekomendowane w PN-EN ISO 11290-1:1999/A1:2005 i późniejszej PN-EN ISO 11290-1:2017-07. Otrzymane izolaty o potwierdzonej przynależności gatunkowej posiewano na podłoże stałe tryptonowo-sojowe lub zawieszano w bulionie BHI i mrożono, w celu przeprowadzenia kolejnych badań. W rozdziale dotyczącym materiałów, Doktorantka zamieściła także wykaz pozostałych odczynników i drobnego sprzętu laboratoryjnego, a także krótko omówiła zastosowane oprogramowanie komputerowe.

Wykorzystane rodzaje metod wraz z analizą statystyczną, relatywnie szczegółowo oraz w kolejności zgodnej z realizacją badań zostały opisane przez Autorkę w jedenastu podrozdziałach, należących do części **Metody**.

W pierwszym podrozdziale Metod Autorka rozprawy opisała sposób określenia przynależności rodzajowej i gatunkowej izolatów (wstępne namnażanie w bulionie pół-Frasera, inkubacja oraz przeszczepianie próbek o charakterystycznym wybarwieniu na podłoże stałe ALOA). W drugim podrozdziale krótko omówiono izolację DNA bakteryjnego, którą wykonano stosując metodę kolumnkową. W dalszej kolejności przedstawiono analizę różnicowania *L. monocytogenes* od pozostałych *Listeria* spp., polegającą na rozdziale elektroforetycznym produktów reakcji dupleks-PCR. Określenie pokrewieństwa genetycznego 74 izolatów, jako kolejny, logiczny krok w badaniach, przeprowadzono metodą RAPD (ang. *Random Amplification of Polimorphic DNA*, Przypadkowa Amplifikacja Polimorficznego DNA), został

omówiony w podrozdziale czwartym. Celem ustalenia przynależności do serogrup, jak w dalszej części rozdziału wskazuje Autorka, posłużono się procedurą opracowaną przez naukowca Doumitha i jego zespół badawczy, zgodnie z którą badaniu poddano próbki, będące przedstawicielami grup filogenetycznych, wyłonionych na podstawie dendrogramu. Podrozdział szósty poświęcono omówieniu wykrywania genów kodujących wybrane czynniki wirulencji techniką multipleks PCR, przy użyciu której wykrywano obecność u badanych szczepów *L. monocytogenes* 10 genów kodujących następujące czynniki wirulencji: białko FbpA (*fbpA*), fosfolipazy (*plcA* i *plcB*), listeriolizyny O (*hlyA*), internaliny (*inlA* i *inlB*), białko powierzchniowe (*actA*), adhezyny (*iap*), metaloproteazy (*mpl*) oraz czynnik regulujący zjadliwość (*prfA*). Badaniu poddano próbki reprezentujące grupy filogenetyczne, wyłonione na podstawie dendrogramu. W podrozdziale siódmym przedstawiono jeden z bardziej kluczowych dla recenzowanej dysertacji doktorskiej test, dotyczący wpływu trzech substancji przeciwdrobnoustrojowych: nizyny, lizozymu i bakteriofaga metodą mikroplątkową, celem określenia ich MIC (minimalnego stężenia hamującego) oraz MBC (minimalnego stężenia bakteriobójczego) dla szczepów *L. monocytogenes*. Informacje zawarte w podrozdziale ósmym, adresowanym określeniu zdolności szczepów *L. monocytogenes* do tworzenia biofilmu oraz wpływu różnych czynników na ten proces, zostały uporządkowane w trzech częściach, zatytułowanych kolejno: (1) określenie zdolności do tworzenia biofilmu (A. w hodowli bakterii na agarze z czerwienią Kongo oraz B. metodą mikroplątkową), (2) wpływ nizyny, lizozymu i bakteriofaga na wytwarzanie biofilmu, (3) ocena wpływu nizyny, lizozymu i bakteriofaga na eradykację wytworzonego wcześniej biofilmu. W podrozdziale niniejszym istotne informacje zostały przekazane w sposób rzeczowy i skrupulatny. Kolejna część rozdziału, raportującego rodzaje zastosowanych w dysertacji metod, odnosi się do oceny antybiotykoodporności. Oporność izolatów na antybiotyki oceniano przy zastosowaniu metody krążkowo-dyfuzyjnej oraz w oparciu o *Tabele interpretacji wartości granicznych minimalnych stężeń hamujących (MIC) oraz wielkości stref zahamowania wzrostu* (wersja 11.0, obowiązująca od 1.01.2021 r.). Przedostatni, dziesiąty podrozdział dotyczy określenia wpływu wybranych środków dezynfekcyjnych. **Zawarte w nim, a także w pozostałych częściach analizowanego rozdziału, liczne tabele są nośnikiem czytelnych, informacji i stanowią ważny element niniejszego opracowania.** Ostatni fragment rozdziału „Metody” dotyczy analizy statystycznej wyników.

Nieznaczące dla zawartości merytorycznej uchybienia, na które ogólnie chciałabym zwrócić uwagę, to: brak wyjaśnienia skrótów niektórych substancji chemicznych (np. bulion BHI, bufor TBE), brak odniesień do literatury (np. podrozdział 4.2.6, 4.2.7., 4.2.10, 4.2.11), brak pełnych danych niektórych producentów odczynników czy sprzętu laboratoryjnego.

Kwestie, które w mojej opinii należałoby opatrzyć w dodatkowe wyjaśnienia, zostały ujęte w następujących pytaniach:

1. str. 47. „2. Pozostałe: posadzka, skrzynie z warzywami, drobny sprzęt, myjka na buty, kratka ściekowa, szczotki na buty, kurtka, spodnie, buty, śluza myjąco-dezynfekująca, zsymp, schody, woda do płukania warzyw.”

Z jakich przyczyn analizowana była woda do płukania warzyw?

2. str. 54. „Przetestowano wpływ trzech różnych substancji przeciwdrobnoustrojowych: nizyny, lizozymu i bakteriofaga metodą mikroplątkową”

Co było przesłanką wyboru wskazanych substancji przeciwdrobnoustrojowych do realizacji prac badawczych?

3. str. 59. „Tabela 19. Środki dezynfekcyjne testowane w badaniach”

Czy związki przedstawione w tabeli 19 przeznaczone są do ogólnej dezynfekcji obiektów i elementów produkcyjnych żywności?

Rozdział 5. (s. 62-79) stanowi prezentację WYNIKÓW prac badawczych zrealizowanych przez Doktorantkę. Rozdział niniejszy został podzielony na dziewięć podrozdziałów, korelujących z zadaniami badań przedstawionymi w metodyce. Kolejno zaprezentowano wyniki dotyczące: (1) określenia przynależności rodzajowej i gatunkowej



izolatów, (2) różnicowania szczepów *L. monocytogenes* od pozostałych *Listeria spp.* metodą dupleks-pcr, (3) określenia pokrewieństwa genetycznego izolatów, (4) serogrupowania szczepów bakteryjnych, (5) wykrywania genów kodujących wybrane czynniki wirulencji techniką multiplex pcr, (6) określenia MIC i MBC czynników antybakteryjnych z wykorzystaniem metody mikropłytkowej, (7) określenia zdolności szczepów *L. monocytogenes* do tworzenia biofilmu bakteryjnego i wpływu różnych czynników na ten proces, (8) oceny antybiotykoodporności szczepów *L. monocytogenes*, (9) określenia wpływu wybranych środków dezynfekcyjnych. Uzyskane rezultaty opracowano w sposób jasny i syntetyczny, z wykorzystaniem dostępnych narzędzi do analizy i wizualizacji danych. Opisy tabel, wykresów i rysunków nie budzą zastrzeżeń. Niewielka **uwaga dotyczy** wykresów: zmiana wielkości czcionki, czy stosowanie wyróżnień *bold* zdecydowanie ułatwiłoby weryfikację przedstawionych zależności.

Prezentacja otrzymanych wyników badań stanowi cenne źródło usystematyzowanej wiedzy – począwszy od możliwości skutecznej identyfikacji bakterii *L. monocytogenes*, przez potencjalne drogi ich transmisji i patogenności wobec człowieka, po metody zwalczania przy zastosowaniu m.in. wybranych antybiotyków i środków dezynfekcyjnych.

Pytania, które kierują do niniejszej części pracy zamieszczone są poniżej:

1. str. 65. „Stwierdzono, że izolaty należące do szczepów 1 i 6 pochodziły wyłącznie z wymazów z linii produkcyjnej, natomiast izolaty należące do szczepów 2, 9, 10 i 11 pochodziły wyłącznie z mrożonych produktów i nie stwierdzono ich obecności w innych badanych próbkach. Szczepy 3, 4, 7, 8 i 12 obejmowały izolaty pochodzące z wymazów i mrozonek, co mogło sugerować, że bakterie *L. monocytogenes* obecne na powierzchniach zakładu przedostały się do mrozonek. W przypadku szczepu 5 izolaty pochodziły zarówno z wymazów ze środowiska zakładu, jak i świeżych surowców i produktów, na podstawie czego należy wnioskować, że doszło do transmisji bakterii z surowca do środowiska zakładu lub ze środowiska zakładu do produktu. Izolaty w obrębie szczepu 13 pochodziły z surowców i mrozonek, co wskazuje na możliwą transmisję *L. monocytogenes* z surowca do produktu.” Czy podana analiza może świadczyć o nieodpowiedniej dezynfekcji monitorowanego zakładu przetwórczego? Po jakim czasie mrożonki były pobierane do badań, od momentu ich wyprodukowania?

2. str. 75. „W wyniku oceny wpływu wybranych substancji antybakteryjnych: nizyny, lizozymu i bakteriofaga stwierdzono, że wszystkie substancje wykazywały wpływ na eradykację wytworzonego wcześniej biofilmu, zarówno w warunkach 37°C jak i 20°C”

Czy na tym etapie badań Autorka pracy potrafiłaby wyjaśnić, dlaczego środki dezynfekujące nie są całkowicie skuteczne?

Rozdział 6. (s. 80-85) prezentuje wnikliwą DYSKUSJĘ uzyskanych wyników, odnoszącą się do rezultatów badań przeprowadzonych przez innych naukowców, o zbliżonej tematyce. Autorka rozprawy doktorskiej w swoich rozważaniach powołała się na literaturę o zasięgu krajowym i międzynarodowym.

Niniejszy rozdział pracy, Pani mgr inż. Martyna Zielińska-Tadych zaprezentowała w sposób korespondujący z wcześniej omówionymi wynikami pracy. W pierwszym akapicie Doktorantka przypominała ogólne informacje związane z występowaniem pałeczek *L. monocytogenes*, drogami rozprzestrzeniania się tych bakterii w zakładach oraz aktualnymi problemami nabywania przez nie oporności na powszechnie stosowane środki dezynfekcyjne i antybiotyki. W kolejnych fragmentach Autorka nawiązała do wyników kolejno uzyskiwanych w badaniach własnych, interpretując je i prowadząc analizę porównawczą z osiągnięciami innych naukowców, a także objaśniając mechanizmy oraz warunki przebiegu istotnych procesów (np. zakażenia *L. monocytogenes*, formowania biofilmu). **Omawiana część opracowania została sformułowana konstruktywnie i bardzo przejrzysto, co pozwoliło na łatwe wyłonienie następujących, przewodnich dla dysertacji sformułowań:**

1. „Za główny wektor zakażenia wskazać należy świeże surowce, za pośrednictwem których chorobotwórcze bakterie rozprzestrzeniły się na terenie obu monitorowanych obiektów.”

2. „Wysoka patogenność bakterii jest ściśle skorelowana z występowaniem określonych genów wirulencji (...). W toku przeprowadzonych badań stwierdzono, że największy odsetek badanych szczepów (30,8%) posiadał następujące geny kodujące czynniki wirulencji: *fbpA*, *hlyA*, *plcA*, *plcB*, *actA*, *inlB*, *iap*, *prfA* (...).”

3. „Istotnym czynnikiem zwiększającym ryzyko wtórnego skażenia żywności jest zdolność pałeczek *L. monocytogenes* do formowania biofilmu. (...). Zebrane wyniki pozwalają jednak wnioskować, że zastosowane czynniki antybakteryjne (czyt. *nizyna*, *lizozym*, *bakteriofaga ListexTM P-100*) istotnie przyczyniły się do ograniczania biofilmu *L. monocytogenes* w większości badanych przypadków (...).”

4. „Zjawisko antybiotykooporności jest coraz częściej obserwowane we współczesnej medycynie i weterynarii (...). W badaniach własnych wykazano, że 30,7% szczepów charakteryzowało się opornością na wszystkie zastosowane antybiotyki.”

5. „W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że najskuteczniejszymi środkami w ograniczaniu rozwoju *L. monocytogenes* były środki z rodzaju chlorowców oraz związków utleniających.”

6. „Na podstawie przeprowadzonych badań należy stwierdzić, że zabiegi czyszczenia i dezynfekcji surowców roślinnych nie są wystarczające, aby skutecznie ograniczyć transmisję *L. monocytogenes* (...) Można zatem wnioskować, iż monitoring mikrobiologiczny prowadzony w zakładach przetwórczych może stanowić skuteczne narzędzie (...). Konieczne jest także systematyczne badanie cech fenotypowych i genotypowych *L. monocytogenes* (...).”

Podsumowując, rozdział *Dyskusja* oceniam jako bardzo dobrze napisaną część rozprawy doktorskiej, dającą świadectwo wysokiego poziomu dojrzałości naukowej Pani mgr inż. Zielińskiej-Tadych.

Rozdział 7. (86-87) stanowią WNIOSKI, które w obecnej formie uważam za nazbyt obszerne. Podstawą wniosków w rozprawie doktorskiej powinny być osiągnięcia badawcze, stanowiące odniesienie do celów pracy i hipotez badawczych. Potwierdzam, że zarówno w treści pracy, jak i we wnioskach odnotowałam jednoznaczne dowody realizacji celów i potwierdzenia postawionych hipotez. Niemniej wnioski mogłyby ulec niewielkiemu skróceniu i/lub przeformułowaniu. Wniosek nr 1 jest zasadniczo powieleniem fragmentu metodyki badawczej. Z kolei wnioski nr 6 i 7, z jednej strony są bardzo do siebie podobne, z drugiej niespójne – uważam, że ich połączenie byłoby korzystniejszym. **We wnioskach, nie odnotowałam również wyraźnego podkreślenia osiągnięć pracy**, w tym istniejących w niej elementów nowości naukowej.

Rozumiem jednak, że konsekwencja Autorki w utrzymaniu pewnego schematu formułowania/porządkowania treści, mogła przełożyć się na sposób prezentacji wniosków.

Proszę, aby Autorka recenzowanej pracy doktorskiej, w trakcie obrony zwięźle odpowiedziała na zadane pytania i odniosła się do typowo merytorycznych uwag. Wskazane, nieliczne uchybienia, jak m.in.: brak wykazu skrótów, pełnych danych niektórych odczynników/sprzętu, brak wybranych odniesień do literatury przedmiotu, słaba jakość niektórych rysunków czy potknięcia edycyjne (przykładowo: str. 16 „to różnego typu komórek”, str. 33 „pobór próbek powinien odbywać się”, str. 62 „do gatunki”), nie umniejszają merytorycznej wartości pracy, którą oceniam wysoko. Wyrażam nadzieję, że sformułowane przeze mnie uwagi pozwolą uniknąć pewnych nieprawidłowości na etapie przygotowywania publikacji lub materiałów konferencyjnych.

5. Ocena końcowa

Recenzowana praca doktorska dotyczy monitoringu szczepów *Listeria monocytogenes* w surowcach, produktach i środowisku zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego. Rozprawę niniejszą charakteryzuje rzetelność i kompleksowe podejście do problemu eradykacji *Listeria* spp. ze środowiska zakładów przetwórczych.



Efektom połączenia wiedzy i doświadczenia Doktorantki z zakresu mikrobiologii, biologii molekularnej i technologii żywności, jest odkrycie i sformułowanie bardzo interesujących dla podjętego tematu kwestii. Autorka wykazała się umiejętnościami samodzielnego planowania oraz realizacji badań naukowych, a także dużym potencjałem analitycznym oraz dojrzałością w prezentacji i ocenie uzyskanych wyników.

Przedstawione w rozprawie doktorskiej wyniki zawierają szereg elementów noszących znamiona nowości naukowej. Do najważniejszych osiągnięć pracy zaliczyć należy: (1) wskazanie potencjalnych dróg transmisji bakterii na terenie zakładów przetwórczych, (2) oznaczenie serotypów izolatów *Listeria* spp. oraz występowania genów kodujących wybrane czynniki wirulencji, (3) zdefiniowanie wrażliwości badanych szczepów na działanie czynników antybakteryjnych, takich jak nizyna, lizozym, bakteriofagi oraz wpływu tych czynników na wytwarzanie i eradykację biofilmu, a także (4) ustalenie oporności szczepów *L. monocytogenes* na wybrane antybiotyki, w tym m.in. meropenem.

Rozprawa wnosi nowe wartości poznawcze i wykazuje istotne cechy aplikacyjne dla problematyki związanej z poprawą stanu środowiska produkcyjnego i żywności, a tym samym zmniejszeniem ryzyka zachorowania konsumentów.

Biorąc pod uwagę walory naukowe, poznawcze oraz aplikacyjne recenzowanej rozprawy doktorskiej zatytułowanej „*Monitoring szczepów Listeria monocytogenes w surowcach, produktach i środowisku zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego*” jednoznacznie stwierdzam, że spełnia ona wymagania określone w art. 13, ust. 1 stawiane rozprawom doktorskim zawarte w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789), art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. poz. 1669) oraz wnioskuję o dopuszczenie mgr inż. Martyny Tadych-Zielińskiej do publicznej obrony przed Radą Dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich.

Poznań, 31 sierpnia 2023 r.


prof. UPP dr hab. inż. Agnieszka Pilarska