
AUTOREFERAT

PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS DOROBKU I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

Dr inż. Krzysztof Skowron

Katedra i Zakład Mikrobiologii

Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera

w Bydgoszczy

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Bydgoszcz 2018

Spis treści:

1	Dane personalne:	3
2	Posiadane dyplomy, stopnie naukowe - z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej	3
3	Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych / artystycznych ...	4
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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)	4
4.1.	Tytuł osiągnięcia naukowego	4
4.2.	Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:.....	5
4.3.	Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	7
4.3.1.	Wstęp	7
4.3.2.	Cel naukowy osiągnięcia	11
4.3.3.	Omówienie wyników przedstawionych w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	12
4.3.4.	Najważniejsze wyniki przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego	27
4.3.5.	Perspektywy badawcze związane z osiągnięciem naukowym.....	28
5	Omówienie zainteresowań naukowo-badawczych i pozostałych osiągnięć.....	29
6	Podsumowanie dorobku naukowego	38
6.1.	Wskaźniki bibliometryczne dorobku.....	39
6.2.	Pozapublikacyjne elementy dorobku naukowego	40
6.2.1.	Granty i projekty	40
6.2.2.	Stáže naukowe	40
6.2.3.	Kursy, szkolenia, seminaria szkoleniowe, warsztaty	41
6.2.4.	Nagrody i wyróżnienia.....	42
6.2.5.	Recenzje manuskryptów naukowych.....	42
6.2.6.	Współpraca naukowo-badawcza z jednostkami naukowymi i przemysłem.....	43
6.3.	Osiągnięcia dydaktyczne	45
6.4.	Dorobek organizacyjny.....	47
6.5.	Dorobek popularyzatorski	48
7	Piśmiennictwo	50

1 Dane personalne:

Imię i nazwisko: **Krzysztof Skowron**

Data urodzenia: **24 marca 1983 r.**

Miejsce pracy: **Katedra i Zakład Mikrobiologii, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. M. Curie Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz**

Dane kontaktowe: **krzysztof.skowron@cm.umk.pl**

2 Posiadane dyplomy, stopnie naukowe - z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

28.10.2011 Stopień doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika – Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. J.J. Śniadeckich w Bydgoszczy

Tytuł rozprawy doktorskiej: Higieniczne aspekty biologicznych i fizycznych metod uzdatniania gnojowicy

Promotor: dr hab. inż. Halina Olszewska, prof. nadzw. UTP

11.01.2007 Magister inżynier ochrony środowiska w specjalności ochrona środowiska przyrodniczego – Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. J.J. Śniadeckich w Bydgoszczy

Tytuł pracy magisterskiej: Badania laboratoryjne przeżywalności *Salmonella* Senftenberg W775 w składowanej gnojowicy

Promotor: dr inż. Halina Olszewska

08.07.2005 Inżynier ochrony środowiska – Wydział Zootechniczny, Akademia Techniczno-Rolnicza im. J.J. Śniadeckich w Bydgoszczy

Tytuł pracy inżynierskiej: Immunologia transplantacyjna

Promotor: dr inż. Halina Olszewska

3 Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych / artystycznych

- 01.10.2015 r. - obecnie ADIUNKT, Katedra i Zakład Mikrobiologii, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu; 85-094 Bydgoszcz, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 9
- 01.08.2013 r. - 30.09.2015 r. ASYSTENT, Katedra i Zakład Mikrobiologii, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu; 85-094 Bydgoszcz, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 9
- 01.03.2012 r. - 15.12.2012 r. ADIUNKT NAUKOWY, Zakład Chemii i Technologii Paliw, Politechnika Wrocławska; 50-370 Wrocław, ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27
- 01.06.2011 r. - 31.07.2013 r. SPECJALISTA NAUKOWO-TECHNICZNY, Katedra i Zakład Mikrobiologii, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu; 85-094 Bydgoszcz, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 9

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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Ocena występowania, charakterystyka oraz wybrane fizyczne i chemiczne metody eliminacji pałeczek *Listeria monocytogenes* w zakładach przetwórstwa spożywczego w aspekcie bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności i zdrowia konsumenta

4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

Osiągnięcie naukowe przedłożone do oceny obejmuje **5 oryginalnych prac twórczych** o łącznej punktacji: **IF_{rok publikacji} – 13,177, IF_{5-letni} – 15,955 i MNiSW – 165**. W każdej z prac jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem.

P1. **Skowron K**, Kwiecińska-Piróg J, Grudlewska K, Świeca A, Paluszak Z, Bauza-Kaszewska J, Wałęcka-Zacharska E, Gospodarek-Komkowska E, 2018: The occurrence, transmission, virulence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* in fish processing plant. Int J Food Microbiol. 282: 71-83. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.011>

IF_{rok publikacji} – 3,451, IF_{5-letni} – 3,972, MNiSW – 40

Indywidualny wkład w powstanie pracy: opracowanie koncepcji badań i udział w opracowaniu metodyki doświadczenia, pozyskanie materiału do badań, udział w przeprowadzaniu badań laboratoryjnych, opracowanie i analiza statystyczna wyników, zbieranie piśmiennictwa, przygotowanie manuskryptu oraz kierowanie zespołem realizującym badania i przygotowującym publikację

Udział procentowy: 65%

P2. **Skowron K**, Grudlewska K, Kwiecińska-Piróg J, Gryń G, Śrutek M, Gospodarek-Komkowska E, 2018: Efficacy of radiant catalytic ionization to reduce bacterial populations in air and on different surfaces. Sci Total Environ. 610-611: 111-120. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.032>

IF_{rok publikacji} – 4,610, IF_{5-letni} – 4,984, MNiSW – 40

Indywidualny wkład w powstanie pracy: opracowanie koncepcji eksperymentu i metodyki badań, pozyskanie materiału do badań, współudział w zaprojektowaniu hermetycznej komory do badań skuteczności promieniowej jonizacji katalitycznej, współuczestnictwo w wykonaniu części laboratoryjnej doświadczenia, zebraniu i analizie wyników, współudział w przygotowaniu tekstu manuskryptu oraz kierowanie zespołem realizującym badania i przygotowującym publikację

Udział procentowy: 75%

P3. **Skowron K**, Grudlewska K, Krawczyk A, Gospodarek-Komkowska E, 2018: The effectiveness of radiant catalytic ionization in inactivation of *Listeria monocytogenes* planktonic and biofilm cells from food and food contact surfaces as a method of food preservation. J Appl Microbiol. 124(6): 1493-1505. <https://doi.org/10.1111/jam.13715>

IF_{rok publikacji} – 2,160, IF_{5-letni} – 2,677, MNiSW – 30

Indywidualny wkład w powstanie pracy: opracowanie koncepcji badań i metodyki doświadczenia, pozyskanie materiału do badań, udział w przeprowadzaniu badań laboratoryjnych, opracowanie i analiza statystyczna wyników, zbieranie piśmiennictwa, przygotowanie manuskryptu oraz kierowanie zespołem realizującym badania i przygotowującym publikację

Udział procentowy: 80%

- P4. **Skowron K**, Grudlewska K, Gryń G, Skowron KJ, Świeca A, Paluszak Z, Zimek Z, Rafalski A, Gospodarek-Komkowska E, 2018: Effect of electron beam and gamma radiation on drug-susceptible and drug-resistant *Listeria monocytogenes* strains in salmon under different temperature. J Appl Microbiol. <https://doi.org/10.1111/jam.13902>

IF_{rok publikacji} – 2,160, IF_{5-letni} – 2,677, MNiSW – 30

Indywidualny wkład w powstanie pracy: opracowanie koncepcji badań i metodyki doświadczenia, pozyskanie materiału do badań, udział w przeprowadzaniu badań laboratoryjnych, opracowanie i analiza statystyczna wyników, zbieranie piśmiennictwa, przygotowanie manuskryptu oraz kierowanie zespołem realizującym badania i przygotowującym publikację

Udział procentowy: 60%

- P5. **Skowron K**, Hulisz K, Gryń G, Olszewska H, Wiktorczyk N, Paluszak Z, 2018: Comparison of selected disinfectants efficiency against *Listeria monocytogenes* biofilm formed on various surfaces. Int Microbiol. 21: 23-33. <https://doi.org/10.1007/s10123-018-0002-5>

IF_{rok publikacji} – 0,796, IF_{5-letni} – 1,645, MNiSW – 25

Indywidualny wkład w powstanie pracy: opracowanie koncepcji badań i metodyki doświadczenia, pozyskanie materiału do badań, udział w przeprowadzaniu badań laboratoryjnych, opracowanie i analiza statystyczna wyników, zbieranie piśmiennictwa, przygotowanie manuskryptu oraz kierowanie zespołem realizującym badania i przygotowującym publikację

Udział procentowy: 70%

4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

4.3.1. Wstęp

Bezpieczeństwo i higiena produkcji oraz przechowywania żywności stanowi obecnie ważny element zapobiegania zakażeniom i zatruciom pokarmowym u ludzi. Kontrola poziomu skażenia mikrobiologicznego surowców i produktów gotowych pozwala określić, na jakim etapie doszło do skażenia i, czy produkt nie stanowi zagrożenia dla konsumenta. Bezpieczna żywność jest jednym z warunków gwarantujących utrzymywanie zdrowia w społeczeństwie, a spożycie zanieczyszczonej żywności może stanowić potencjalne ryzyko wystąpienia zakażeń przewodu pokarmowego czy zatruc pokarmowych.

Problem z utrzymaniem czystości mikrobiologicznej żywności występuje na całym świecie, począwszy od krajów rozwiniętych, w których standardy produkcji żywności są ściśle zdefiniowane, po kraje rozwijające się, gdzie ryzyko wystąpienia ognisk epidemicznych jest wysokie. Ponadto, straty ekonomiczne z powodu chorób w populacji ludzkiej wywołanych przez drobnoustroje przenoszone przez żywność, choć trudne do oszacowania, według Światowej Organizacji Zdrowia (ang. World Health Organization, WHO) są wysokie. Departament Rolnictwa Stanów Zjednoczonych (ang. United States Department of Agriculture, USDA) szacuje roczne koszty związane z zakażeniami i zatruciami pokarmowymi u ludzi na około 36 miliardów dolarów (Minor i wsp., 2015).

W produkcji spożywczej nie mogą być obecne drobnoustroje chorobotwórcze, a liczba drobnoustrojów niechorobotwórczych również musi być ściśle określona i przestrzegana tak, aby nie dochodziło do psucia produktu. Do drobnoustrojów chorobotwórczych, niepożądanych w produktach spożywczych, należą, m.in.: *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., werotoksyczne szczepy *Escherichia coli* oraz pałeczki *Listeria monocytogenes*. W raporcie Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. European Food Safety Authority, EFSA) opublikowanym w 2017 roku wykazano wzrost zachorowalności na główne choroby odzwierzęce występujące na terenie Unii Europejskiej (UE) w okresie ostatnich kilku lat (EFSA i ECDC, 2017). W 2016 roku najczęściej zgłaszaną zoonozą była kamylobakterioza - zgłoszono 246 307 przypadków. Drugą, co do częstości występowania w 2016 roku chorobą odzwierzęcą na terenie krajów UE była salmonelloza - zgłoszono 94 530 przypadków (EFSA i ECDC, 2017). Należy podkreślić, że zakażenia przenoszone przez żywność związane są również z licznymi hospitalizacjami oraz zgonami pacjentów. Według WHO z powodu

zakażeń układu pokarmowego odnotowuje się rocznie ponad 400 000 zgonów na świecie (WHO, 2017).

Poważny problem w skali światowej stanowi narastająca wśród bakterii i grzybów oporność na antybiotyki i inne środki przeciwdrobnoustrojowe. Antybiotyki stosowane podczas produkcji żywności mogą być przyczyną narastającej oporności na antybiotyki stosowane w medycynie wśród szczepów wywołujących zakażenia u ludzi. Mimo, że obecnie w wielu krajach są realizowane i uaktualniane programy ograniczania stosowania antybiotyków w hodowli zwierząt i uprawach roślin, istnieje ryzyko krzyżowej transmisji genów oporności na antybiotyki między szczepami tego samego lub różnych gatunków drobnoustrojów przez żywność pochodzenia zwierzęcego i roślinnego, kontakt ludzi ze zwierzętami lub skażoną wodę (Tang i wsp., 2017). Wykazano związek między opornością bakterii na środki dezynfekcyjne, a narastającą opornością na antybiotyki. Tego typu korelację wykazano wśród szczepów narażonych na subinhibicyjne stężenia środków dezynfekcyjnych, izolowanych z różnych środowisk, w tym zakładów przetwórstwa żywności (Khan i wsp., 2016; Capitai Alonso-Calleja, 2013).

Pałeczki *L. monocytogenes* to Gram-dodatnie, względnie beztlenowe, ruchliwe, nie wytwarzające przetrwalników bakterie, które są rozpowszechnione w środowisku naturalnym, w tym w glebie, wodzie, ściekach oraz odchodach ludzkich i zwierzęcych. Stanowią jeden z najbardziej niebezpiecznych odzwierzęcych czynników chorobotwórczych dla ludzi przenoszonych przez żywność (Jeyaletchumi i wsp., 2010). Wykazują zdolność do wzrostu w szerokim zakresie temperatur (0,5 - 45°C), pH (4,7 – 9,2) i ciśnienia osmotycznego (do 10,0% NaCl). Cechy te pozwalają im na przetrwanie w niekorzystnych warunkach środowiska podczas obróbki i przechowywania żywności, np. w chłodniach w zakładach przetwórstwa żywności (Dongyou, 2008; Vázquez-Boland i wsp., 2001).

Pałeczki *L. monocytogenes* są czynnikiem etiologicznym listeriozy, choroby rozprzestrzeniającej się przede wszystkim za pośrednictwem żywności skażonej tymi bakteriami.

U osób dorosłych przebieg zakażenia *L. monocytogenes* jest najczęściej bezobjawowy. Niekiedy dochodzi do zapalenia błony śluzowej żołądka i jelit. U osób z grup ryzyka (tj. u osób z obniżoną odpornością, noworodków, kobiet ciężarnych, osób starszych oraz chorych na AIDS) może rozwinąć się zapalenie płuc, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych oraz sepsa z towarzyszącymi ropniami skóry. Liczba potwierdzonych przypadków listeriozy w krajach UE systematycznie wzrasta od 2012 roku, w którym wynosiła 1 720 zachorowań

i 143 zgony. W 2016 roku notowano 2 536 przypadków listeriozy i 247 zgonów z jej powodu (EFSA i ECDC, 2017). W 2016 roku wykazano wzrost liczby przypadków listeriozy w porównaniu z rokiem poprzednim, mimo, że obecność *L. monocytogenes* w próbkach żywności rzadko przekracza poziom bezpieczeństwa obowiązujący w UE (EFSA i ECDC, 2017), a współczynnik zapadalności na listeriozę wynosił 0,47 przypadków na 100 000 mieszkańców. Oznacza to wzrost o 9,3% w porównaniu do 2015 roku (EFSA i ECDC, 2017).

W Polsce, w latach 2008-2016, również stwierdzono systematyczny wzrost liczby przypadków zakażeń o etiologii *L. monocytogenes*. Według danych Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego, w latach 2004-2008 notowano 28 przypadków, w 2009 roku - 33, 2013 roku - 54, a w 2014 roku - 83 przypadki zakażeń. W 2015 roku liczba ta wynosiła 69, a w 2016 roku - 99.

W skali świata notowano także wiele epidemii listeriozy związanych ze spożyciem skażonej żywności. Aktualnie, tj. według danych za okres od 1 stycznia 2017 roku do 27 kwietnia 2018 roku, w Republice Południowej Afryki istnieje jedno z największych ognisk epidemicznych listeriozy związane z gotowymi do spożycia, przetworzonymi produktami mięsnymi zanieczyszczonymi pałeczkami *L. monocytogenes*. Dotychczas stwierdzono laboratoryjnie 1024 przypadki listeriozy, z czego 200 (19,5%) było śmiertelnych. Najwięcej przypadków choroby notowano wśród noworodków (≤ 28 dni) oraz osób w grupie wiekowej 15 – 49 lat (Health Department of Republic of South Africa, 2018). Również w Australii w okresie od 17 stycznia 2018 roku do 6 kwietnia 2018 roku stwierdzono 20 przypadków listeriozy związanych ze spożyciem kantalupy, z których 7 było śmiertelnych (WHO, 2018).

W Polsce, w ciągu ostatnich 20 lat, wykryto dwa ogniska zatruc pokarmowych wywołanych przez *L. monocytogenes*, w 2005 i 2010 roku.

Do transmisji pałeczek *L. monocytogenes* najczęściej dochodzi przez zanieczyszczoną żywność. Większość izolowanych szczepów należy do serotypu 4b, a pozostałe do serotypów 1/2a oraz 1/2b. Według raportu EFSA, w 2016 roku liczba pałeczek *L. monocytogenes* była wyższa na etapie przetwarzania żywności, w porównaniu z produktami gotowymi. Najwyższy poziom skażenia stwierdzono w rybach i produktach rybołówstwa (6,2%), następnie w mięsie (2,5%), innych produktach gotowych do spożycia (ang. Ready to Eat, RTE) (1,0%), serach (1,0%), kiełbasach (0,8%), mleku (0,8%) (EFSA i ECDC, 2017).

Zakłady przetwórstwa żywności są zobowiązane do kontroli występowania pałeczek *L. monocytogenes* w produktach spożywczych (Gandhi i Chikindas, 2007). Zdolność tych bakterii do przetrwania w szerokim zakresie warunków środowiskowych oraz zdolność do

tworzenia biofilmu sprawia trudności w ich eradykacji. Pałeczki *L. monocytogenes* mogą przylegać do różnych powierzchni, takich jak: kwarc, granit, marmur, polipropylen, polistyren, stal nierdzewna i szkło (Ayebah, 2005; Królasik i Szosland-Fałtyn, 2015). Tworzenie biofilmu przez szczepy *L. monocytogenes* stanowi poważny problem w zakładach przetwórstwa i może stwarzać niebezpieczeństwo dla zdrowia konsumentów. Istotnym zagrożeniem dla bezpieczeństwa produktu jest zanieczyszczenie mikrobiologiczne w zakładzie przetwórczym, które w konsekwencji może prowadzić do ciągłego skażenia produktu, np. ryb. Wprowadzenie do zakładu przetwórczego zanieczyszczonych mikrobiologicznie surowców wpływa na cały cykl produkcyjny. W kolejnych etapach procesu technologicznego może dochodzić do przenoszenia drobnoustroju na partie nie zanieczyszczonego produktu i utrzymywanie się skażenia, np. w nieprawidłowo mytych i dezynfekowanych halach produkcyjnych oraz urządzeniach stosowanych podczas produkcji. Ponadto, w produktach zanieczyszczonych w trakcie produkcji, nawet w niewielkim stopniu, ale przechowywanych przez dłuższy czas w chłodniach, może dochodzić nie tylko do utrzymywania, ale i do namnażania się tych drobnoustrojów chorobotwórczych, co wynika z ich właściwości biologicznych.

Istotnym czynnikiem decydującym o bezpieczeństwie produkcji i przechowywania żywności w zakładach przetwórstwa spożywczego jest czystość mikrobiologiczna powietrza, która wpływa nie tylko na jakość mikrobiologiczną wyrobów, ale także na zdrowie personelu. Drobnoustroje wchodzące w skład bioaerozolu mogą także sedymentować na powierzchniach maszyn i urządzeń w zakładach spożywczych, prowadząc do ich skażenia mikrobiologicznego i potencjalnie przyczyniając się do zanieczyszczenia przetwarzanej żywności. Powietrze jest jednym ze źródeł, a zarazem drogą przenoszenia niepożądanych drobnoustrojów we wszystkich obszarach przetwarzania i przechowywania żywności (Shale i Lues, 2007; Syne i wsp., 2013). W skład mikroflory powietrza wchodzi drobnoustroje pochodzące z surowców, środków produkcji, opakowań, urządzeń wentylacyjno-klimatyzacyjnych oraz od pracowników. Często źródłem drobnoustrojów w powietrzu są niewłaściwie przeprowadzane zabiegi higieniczne, prowadzące do generowania bioaerozolu bakteryjnego. Mimo, że powietrze jest środowiskiem okresowego przebywania drobnoustrojów, to jednak zachowują one swój potencjał zakaźny, a ruch powietrza podczas wykonywania różnych czynności związanych z przetwórstwem żywności, sprzyja ich przemieszczaniu (Salustiano i wsp., 2003; Flannigan i wsp., 2011).

Skuteczne metody mycia i dezynfekcji w zakładach przetwórstwa żywności są w stanie w dużym stopniu ograniczyć skażenie mikrobiologiczne powietrza i powierzchni. Największe zagrożenie dla prawidłowości przeprowadzanych procesów mycia i dezynfekcji stanowi użycie

nieprawidłowych stężeń środków biobójczych. Drobnoustroje mogą być wówczas eksponowane na ich subinhibicyjne stężenia, co w konsekwencji może prowadzić do narastania na nie oporności. Zjawisko, to jest szczególnie istotne w przypadku biofilmów bakteryjnych, które wymagają do usunięcia znacznie wyższych stężeń dezynfektantów. Równie ważne jest zapewnienie bezpieczeństwa żywności w trakcie pracy linii technologicznej, co skutkuje koniecznością stosowania metod ograniczających możliwość skażenia, a jednocześnie bezpiecznych dla personelu. Z tego względu konieczne jest poszukiwanie nowych metod eradykacji drobnoustrojów, które pozwoliłyby ograniczyć zużycie środków dezynfekcyjnych, zminimalizować ryzyko narastania oporności wśród drobnoustrojów, a jednocześnie, które byłyby bardziej skuteczne wobec drobnoustrojów i bezpieczne dla konsumentów oraz środowiska. Niezwykle istotna jest troska o zapewnienie prawidłowej jakości mikrobiologicznej powietrza w zakładach przetwórstwa spożywczego, poprzez stosowanie metod pozwalających na ograniczenie liczby drobnoustrojów występujących w formie bioaerozolu.

4.3.2. Cel naukowy osiągnięcia

Duża tolerancja pałeczek *L. monocytogenes* na niekorzystne warunki środowiska panujące w trakcie procesów produkcji i obróbki żywności oraz wzrostowy trend dotyczący liczby stwierdzanych przypadków listeriozy, stanowiły przesłankę do podjęcia badań mających na celu określenie występowania i potencjału chorobotwórczego pałeczek *L. monocytogenes* oraz przydatności i skuteczności wybranych metod zwalczania form planktonicznych i biofilmowych tych bakterii w żywności i zakładach przetwórstwa spożywczego. Badania były ukierunkowane na:

- ocenę występowania pałeczek *L. monocytogenes* w zakładach przetwórstwa rybnego,
- określenie możliwości aplikacyjnych innowacyjnych metod opierających się na procesach jonizacji i fotokatalizy,
- poszerzenie wiedzy o skuteczności i potencjale stosowanych uprzednio metod sterylizacji fizycznej, wykorzystujących wiązkę wysokoenergetycznych elektronów i promieniowanie gamma oraz dezynfekcji chemicznej.

Zarówno prace zaliczone do osiągnięcia naukowego, jak i wyniki realizowanych i planowanych w przyszłości badań, mają na celu określenie dróg transmisji pałeczek *L. monocytogenes* w zakładach spożywczych oraz zmniejszenie ilości zużywanych, w zakładach przetwórstwa spożywczego, chemicznych środków dezynfekcyjnych,

ograniczenie zjawiska nabywania oporności na dezynfektanty, zwiększenie skuteczności zwalczania biofilmów tworzonych przez drobnoustroje, a przez to podniesienie bezpieczeństwa produkcji i przechowywania żywności, z czym wiąże się także troska o zdrowie jej konsumentów.

4.3.3. Omówienie wyników przedstawionych w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Według danych EFSA, w 2016 roku występowanie pałeczek *L. monocytogenes* potwierdzono w 5,6% produktach rybnych oraz w 4,7% rybnych produktów RTE (EFSA i ECDC, 2017). Natomiast wśród najczęściej zanieczyszczonych tymi pałeczkami surowców w zakładach przetwórczych była kategoria produkty rybołówstwa (6.2%) (EFSA i ECDC, 2017). Wyróżnia się dwie drogi potencjalnego zanieczyszczenia ryb pałeczkami *L. monocytogenes* w zakładach przetwórstwa rybnego (Jami i wsp., 2014):

- rozprzestrzenianie pałeczek z treści jelitowej do innych tkanek (w tym mięśni), szczególnie, gdy czas pomiędzy śmiercią a usunięciem wnętrzości jest dłuższy niż kilka godzin,
- zanieczyszczenie krzyżowe (niewłaściwy transport, użycie skażonego sprzętu do obróbki ryb).

Skażenie ryb może nastąpić również podczas wykonywania takich czynności, jak: filetowanie, płukanie i solenie (Jami i wsp., 2014; Gambarin i wsp., 2012). Do najczęściej zanieczyszczonych miejsc w zakładach przetwórstwa rybnego zalicza się: urządzenia pakujące, odpływy podłogowe, ściany, rury chłodzące, przenośniki wykorzystywane do montażu produktu w opakowania, stojaki do transportu produktów, narzędzia ręczne oraz zamrażarki (Djordjevic i wsp., 2002).

Istotne ryzyko rozprzestrzeniania pałeczek *L. monocytogenes* za pośrednictwem produktów rybnych oraz wykazywany wzrost notowanych przypadków listeriozy w raportach dotyczących Polski, jak i krajów UE, skłoniły mnie do podjęcia badań mających na celu ocenę występowania, potencjalnych dróg transmisji, lekowrażliwości i wirulencji pałeczek *L. monocytogenes* w jednym z największych polskich zakładów przetwórstwa rybnego. Uzyskane wyniki przedstawiono w publikacji **P1** zaliczonej do osiągnięcia naukowego:

P1. Skowron K, Kwiecińska-Piróg J, Grudlewska K, Świeca A, Paluszak Z, Bauza-Kaszewska J, Wałęcka-Zacharska E, Gospodarek-Komkowska E, 2018: The

occurrence, transmission, virulence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* in fish processing plant. *Int J Food Microbiol.* 282: 71-83
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.011>

W niniejszych badaniach wykazano, że wśród pobranych 447 próbek ryb i 109 wymazów ze środowiska produkcyjnego, obecność pałeczek *L. monocytogenes* stwierdzono odpowiednio, w 139 (31,1%) próbkach i w 28 (25,7%) wymazach. W 119 próbkach pobranych z surowca, obecność badanych pałeczek wykazano w 32 (26,9%). Z kolei w wymazach pobranych ze środowiska produkcyjnego, izolaty *L. monocytogenes* wykryto w 18 (34,0%) wymazach pobranych podczas produkcji i 10 (17,9%) po nocnym myciu i dezynfekcji.

Przeprowadzona analiza podobieństwa genetycznego pozwoliła wykazać wśród pozyskanych izolatów, obecność 70 różnych genetycznie szczepów. Większość pozyskanych izolatów należała do jednego szczepu oznaczonego jako RMS1 i pochodziły one głównie z surowca rybnego dostarczonego z farm ryb. Ocena podobieństwa genetycznego badanych izolatów potwierdza, że głównym źródłem szczepów *L. monocytogenes* jest prawdopodobnie ryba pochodząca z farm oraz, że procedury stosowane w zakładach przetwórczych są często niewystarczające, aby wyeliminować skażenie produktów końcowych pałeczkami *L. monocytogenes*.

Ocena lekowrażliwości badanych, różniących się genetycznie, szczepów *L. monocytogenes* przeprowadzona według zaleceń Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości (ang. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST v 7.1) wykazała, że spośród 70 badanych szczepów, 28 (40,0%) było wrażliwych na użyte w doświadczeniu antybiotyki (penicylinę, ampicylinę, erytromycynę, meropenem i kotrimoksazol). Wśród szczepów opornych (42; 60,0%) na przynajmniej jeden antybiotyk, większość wykazywała oporność na erytromycynę (33; 47,1%) i kotrimoksazol (33; 47,1%). Stwierdzono 5 (7,1%) szczepów opornych na wszystkie badane antybiotyki.

Wykazano, że wszystkie pozyskane szczepy *L. monocytogenes* posiadały każdy z badanych genów (*actA*, *fbpA*, *hlyA*, *iap*, *inlA*, *inlB*, *mpl*, *plcA*, *plcB*, *prfA*) kodujących czynniki wirulencji o kluczowym znaczeniu w patogenezie zakażeń.

Otrzymane wyniki pozwoliły pogłębić wiedzę na temat zagrożenia pałeczkami *L. monocytogenes* w zakładach przetwórstwa rybnego w Polsce. Badanie potwierdziło, że pałeczki *L. monocytogenes* stanowią poważny problem w przemyśle rybnym, z którym wiąże się w konsekwencji zagrożenie zdrowia ludzi spożywających tę żywność. Wykazano, że

głównym źródłem zanieczyszczenia środowiska produkcyjnego jest surowiec dostarczany do zakładu przetwórczego z poszczególnych farm rybnych. Ponadto, nie przestrzeganie lub niepełne przestrzeganie zasad Dobrej Praktyki Produkcyjnej w zakładach przetwórstwa rybnego jest poważną przyczyną rozprzestrzeniania się tego patogenu. Ważnym problemem jest oporność na antybiotyki wśród izolowanych szczepów. Stąd, konieczne jest monitorowanie utrzymywania i dróg transmisji pałeczek *L. monocytogenes* w zakładach przetwórstwa ryb oraz wdrażanie odpowiednich programów higieny.

Powyższe wnioski płynące z pracy **P1** oraz z dostępnego piśmiennictwa o tej tematyce, wskazują, że celowe i zasadne jest prowadzenie badań mających na celu opracowanie nowych i doskonalenie istniejących metod higienizacji, jako jednego z głównych sposobów ochrony zdrowia konsumentów.

Podjmując próbę wzbogacenia istniejącego stanu wiedzy na temat zwalczania pałeczek *L. monocytogenes* w przemyśle spożywczym, w pierwszej kolejności skupiono uwagę na możliwości wdrożenia metody efektywnej mikrobiobójczo, a jednocześnie możliwej do zastosowania w sposób ciągły, także podczas obecności personelu przy linii technologicznej. Rozwiązaniem tego problemu wydaje się być wykorzystanie innowacyjnej technologii promieniowej jonizacji katalitycznej (ang. Radiant Catalytic Ionization, RCI). Wyniki przeprowadzonych dotychczas badań nad skutecznością technologii RCI w zapewnieniu bezpieczeństwa żywności i środowiska jej produkcji przedstawiono w dwóch pracach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

P2. Skowron K, Grudlewska K, Kwiecińska-Piróg J, Gryń G, Śrutek M, Gospodarek-Komkowska E, 2018: Efficacy of radiant catalytic ionization to reduce bacterial populations in air and on different surfaces. *Sci Total Environ.* 610-611: 111-120. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.032>

P3. Skowron K, Grudlewska K, Krawczyk A, Gospodarek-Komkowska E, 2018: The effectiveness of radiant catalytic ionization in inactivation of *Listeria monocytogenes* planktonic and biofilm cells from food and food contact surfaces as a method of food preservation. *J Apl Microbiol.* 124(6): 1493-1505. <https://doi.org/10.1111/jam.13715>

Początki badań nad zjawiskiem fotokatalizy sięgają lat 70. XX wieku, kiedy to Fujishima i Honda (1972) odkryli fenomen fotokatalitycznego rozkładu wody na elektrodach pokrytych

tlenkiem tytanu. Początkowo, prace dotyczące nowoodkrytego zjawiska skupiły się na opracowaniu możliwych adaptacji procesu na potrzeby oczyszczania ścieków (Zhao i Yang, 2003). Technologia oczyszczania powietrza z użyciem fotokatalizy heterogenicznej została rozwinięta w latach 90. XX wieku przez Narodową Agencję Aeronautyki i Przestrzeni Kosmicznej (ang. National Aeronautics and Space Administration, NASA). Pierwotnie metoda ta miała za zadanie zmniejszanie stężenia etylenu podczas hodowli roślin na Międzynarodowej Stacji Kosmicznej. W kolejnych latach technologia była rozwijana w kierunku zwiększenia efektywności procesu i została określona, jako promieniowa jonizacja katalityczna (Space Foundation, 2014). Dotychczas na świecie przeprowadzono nieliczne badania nad RCI. Dotyczyły one możliwości zastosowania RCI do usuwania z powietrza substancji uciążliwych zapachowo oraz poprawy jego jakości mikrobiologicznej. W dostępnym piśmiennictwie polskim odnaleziono jedną publikację poglądową (Małecka i Borowski, 2011), w której jednym z opisanych zagadnień były podstawy teoretyczne dezynfekcji powietrza z wykorzystaniem metody RCI.

W badaniach własnych wykorzystano generator RCI firmy ActivTek Sp. z o.o. Opis zasady działania technologii RCI i konstrukcji urządzenia zawarty jest w patencie US 8,585,979 B2 zgłoszonym w dniu 19 października 2013 roku przez Davida Tupman'a. Struktura generatora RCI uwzględnia optymalny przepływ oczyszczanego powietrza. Składa się z matrycy zbudowanej z poliwęglanowych „rurek”, ułożonych równolegle w układzie przypominającym „plaster miodu”. Powłoka elementów matrycy wykazuje właściwości hydrofilowe i zawiera: dwutlenek tytanu, rod, srebro, miedź. Przeciwległe do układu znajduje się źródło promieniowania ultrafioletowego (UV) o szerokim zakresie. Lampa UV wykorzystuje gaz argonowy z rtęcią i włókna karbidowe o zakresie widmowym od 100 do 367 nm. W wyniku utleniania katalitycznego, stymulowanego promieniowaniem UV, na granicy heterogennych faz (gaz - ciało stałe) powstają reaktywne formy tlenu: rodniki hydroksylowe, jony nadadtlenkowe, jony wodorotlenkowe. Wytwarzana jest niewielka ilość ozonu (Grinshpun i wsp., 2007; Małecka i Borowski, 2011).

Emitowane reaktywne formy tlenu generują uszkodzenia oksydacyjne wirusowego materiału genetycznego, a także upośledzają funkcjonalność białek ich kapsydów. W przypadku komórek bakteryjnych dochodzi do oksydacji cząsteczek koenzymu A, skutkującej inhibicją szlaków oddychania komórkowego, oksydacji nienasyconych fosfolipidów i zniszczenia błony zewnętrznej bakterii oraz nagromadzeniem szkodliwych zmian DNA lub RNA (Grinshpun i wsp., 2007). Cząsteczki nieożywione są usuwane

z powietrza na drodze wytrącania elektrostatycznego, wzbudzanego procesem jonizacji (Małecka i Borowski, 2011).

Promieniowa jonizacja katalityczna jest definiowana, jako aktywna technologia oczyszczania powietrza. Urządzenia generujące RCI przeznaczone są do instalacji w systemach ogrzewania, wentylacji i klimatyzacji bądź użytkowania w formie wolnostojącej, niezależnej od istniejących systemów. W odróżnieniu od biernych technologii oczyszczania, wykorzystujących filtry elektryczne bądź promieniowanie ultrafioletowe, technologia RCI pozwala na oczyszczanie powietrza w sposób ciągły i oparty na procesach zbliżonych do tych, które zachodzą w środowisku naturalnym. Według danych producenta oczyszczanie powietrza metodą RCI może być prowadzone w obecności ludzi. Stąd, zastosowanie tej technologii jest polecane szczególnie w miejscach, gdzie niemożliwe jest wprowadzenie regularnych przerw użytkowania dla celów obniżenia liczby drobnoustrojów, jak: zakłady przemysłowe czy miejsca użyteczności publicznej (Moga i Małecka, 2011; Winczewski i Malicki, 2011).

Badania opisane w publikacji **P2** mają szerokie znaczenie aplikacyjne w kwestii troski o zdrowie ludzi, zarówno nas wszystkich, jako konsumentów żywności, ale także pracowników zakładów przetwórczych, a nawet pacjentów i personelu jednostek medycznych (szpitali, przychodni, aptek, zakładów kosmetycznych). Drobnoustroje wchodzące w skład bioaerozolu mogą przyczyniać się do kontaminacji surowców i produktów spożywczych, leków, kosmetyków, powierzchni urządzeń, kanałów wentylacyjnych, urządzeń klimatyzacyjnych, itp. Należy pamiętać, że droga aerogenna jest jedną z głównych dróg rozprzestrzeniania się drobnoustrojów wywołujących zakażenia związane z opieką zdrowotną (ang. Health Care Associated Infection, HAI) (Jung i wsp., 2015). Środowisko szpitalne jest środowiskiem bardzo dynamicznym pod względem mikrobiologicznym. Drobnoustroje mogą dostawać się do powietrza podczas wykonywania zabiegów medycznych, a nawet podczas czynności pielęgnacyjnych i obsługowych pacjentów, jak zmiana opatrunku, bielizny czy pościeli (Shiomori i wsp., 2002), czy też zabiegów kosmetycznych, np. manicure, pedicure. Za pośrednictwem kanałów wentylacyjnych drobnoustroje patogenne mogą rozprzestrzeniać się od jednego chorego na inne sale, a nawet inne kondygnacje budynku, a także mogą sedymentować na powierzchni w innych pomieszczeniach powodując ich kontaminację (Lima i wsp., 2010). Zjawisko generowania bioaerozlu zakaźnego podczas zabiegów mycia i dezynfekcji, zarówno w zakładach przetwórstwa spożywczego, jak i w szpitalach, jest często bagatelizowane. Z tego względu w pracy **P2** położono nacisk na eliminację skażenia mikrobiologicznego z różnych powierzchni. W tym celu, oprócz szczepów wzorcowych, w tej

części badań, zostały wykorzystane szczepy kliniczne i środowiskowe badanych bakterii. W przypadku *L. monocytogenes*, bakterii, nad którą badania stanowią podstawę osiągnięcia naukowego, wykorzystano szczep kliniczny wyizolowany z zakażenia krwi oraz szczep środowiskowy pozyskany ze śmigieł wentylatora chłodni, w której schładzane były produkty po wędzeniu. W badaniach opisanych w publikacji **P2** można wyróżnić dwa zasadnicze obszary zainteresowań badawczych.

Po pierwsze, dokonano oceny skuteczności technologii RCI wobec wybranych szczepów wzorcowych bakterii (*Staphylococcus aureus* ATCC 25213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 8159, formy wegetatywne i spory *Clostridium sporogenes* ATCC 19404) oraz grzybów (*Candida albicans* ATCC 90028, *Aspergillus niger* ATCC 9142 i *Penicillium chrysogenum* ATCC 10106) wprowadzonych do powietrza. Kontaminacji powietrza dokonywano metodą nebulizacji zawiesiny drobnoustrojów we wnętrzu hermetycznej komory opracowanej według pomysłu własnego. Uwzględniając dostępne piśmiennictwo dotyczące badań nad RCI, jest to dotychczas pierwsze i jak dotąd, jedyne tego typu badanie w świecie, jakie przeprowadzono z wykorzystaniem tak licznej i zróżnicowanej grupy szczepów wzorcowych bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich, w tym przetrwalnikujących oraz grzybów drożdżopodobnych i pleśniowych. Uzyskane wyniki badań pozwoliły wykazać, że zastosowanie technologii RCI spowodowało istotny spadek liczby wszystkich badanych gatunków drobnoustrojów. Całkowitą eliminację, tj. spadek liczby poniżej progu detekcji użytych drobnoustrojów z powietrza, uzyskano w przypadku szczepów *E. coli* ATCC 29212 i *C. albicans* ATCC 90028. Dla szczepów *S. aureus* ATCC 25213, *S. epidermidis* ATCC 35984 i *E. faecalis* ATCC 29212 spadek ten kształtował się na poziomie 4-5 rzędów wielkości, a procentowy współczynnik redukcji (PWR) wyniósł 99,9%. Nieco niższą skuteczność higienizacyjną RCI notowano wobec wegetatywnych form bakterii przetrwalnikujących (PWR [%] – od 96,6 do 98,9%) oraz grzybów pleśniowych (PWR [%] – od 96,8 do 99,4%). Najniższą skuteczność RCI wykazano wobec spor *C. sporogenes* ATCC 19404 obecnych w powietrzu. PWR wyniósł w tym przypadku 71,7%. Wykazana różnica w PWR liczby spor zdolnych do germinacji, a liczby form wegetatywnych badanych drobnoustrojów była istotna statystycznie.

Powyższe wyniki wskazują, że technologia RCI może mieć zastosowanie w procesach higienizacji powietrza w różnych typach pomieszczeń, w tym także w halach produkcyjnych oraz magazynach surowca i produktu w zakładach przetwórstwa spożywczego. Zestawienie

powyższych rezultatów z wynikami badań własnych przedstawionymi w raporcie przygotowanym dla firmy ActivTek Sp. z o.o., dotyczącymi oceny skuteczności przepływowej lampy emitującej promieniowanie UV-C w eliminacji wymienionych drobnoustrojów z powietrza, wykazało wyższą skuteczność RCI, szczególnie w przypadku bakterii przetrwalnikujących, dla których wykazana różnica była istotna statystycznie. Może to wskazywać, że RCI stanowi jedną z najskuteczniejszych, aktywnych metod oczyszczania powietrza z drobnoustrojów i daje nadzieję w przyszłości na jej zastosowanie w różnorodnych środowiskach, szczególnie tam, gdzie jest wymagane bezpieczeństwo przeprowadzania procedur związanych z ratowaniem zdrowia, a nawet życia ludzi, np. zakładanie stendów, zabiegi na otwartym sercu, mózgu, jak również przy produkcji żywności.

Wiele materiałów, takich jak: stal nierdzewna, plastik, guma czy szkło jest wykorzystywanych w przemyśle spożywczym. Do kontaminacji powierzchni wykonanych z tych materiałów może dojść w wyniku sedimentacji drobnoustrojów wchodzących w skład bioaerozolu, kontaktu ze skażonym surowcem lub rękami personelu. Drobnoustroje znajdujące się na powierzchniach mogą stać się źródłem zakażeń wśród personelu oraz skażenia żywności (Bagge-Ravn i wsp., 2003). Stopień zanieczyszczenia powierzchni drobnoustrojami zależy od ich właściwości, np. rodzaju materiału, z którego są wykonane, porowatości, hydrofobowości/hydrofilowości, itp. (Ismail i wsp., 2013). Schlegelová i wsp. (2010) wykazali, że może dojść do kontaminacji powierzchni mających kontakt z żywnością bakteriami *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *L. monocytogenes*, *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* i *Salmonella* spp.

W związku z powyższym drugim, poruszonym w publikacji **P2**, nurtem badawczym była ocena skuteczności higienizacji powierzchni z użyciem RCI. Podejście to opierało się na fackie wytwarzania przez moduł RCI, tzw. „aktywnego powietrza” o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. W związku z tym założono, że technologia ta może działać także na drobnoustroje obecne na różnych powierzchniach znajdujących się w obszarze oddziaływania emitera RCI. Koncepcja ta była innowacyjna, a w momencie realizacji badań, w dostępnym piśmiennictwie światowym, odnaleziono tylko jedną publikację (Ortega i wsp., 2007), której autorzy opisali inaktywację bakterii, w tym na powierzchni stali nierdzewnej z wykorzystaniem technologii RCI. W badaniach własnych materiał stanowiły szczepy wzorcowe bakterii (*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Staphylococcus aureus* ATCC 25213, spory *Clostridium*

sporogenes ATCC 19404) oraz grzybów (*Candida albicans* ATCC 90028, *Aspergillus niger* ATCC 9142 i *Penicillium chrysogenum* ATCC 10106) o różnych właściwościach biologicznych. W przypadku badanych gatunków bakterii, użyto także po jednym szczepie klinicznym i środowiskowym. W badaniu zastosowano jałowe fragmenty następujących powierzchni stałych: fornir lakierowany, gres szklwiony, guma, poliamidowa wykładzina dywanowa, polipropylen i stal AISI 304, z których większość ma zastosowanie w produkcji żywności. Przeprowadzone badania pozwoliły wykazać redukcję liczby bakterii pod wpływem działania RCI. Najbardziej odporne na działanie zastosowanej techniki higienizacji okazały się, niezależnie od rodzaju badanej powierzchni, spory *C. sporogenes*, dla których PWR wahał się od -2,6% na gresie szklwionym do 71,2% na fornirze lakierowanym.

Użycie RCI okazało się najskuteczniejsze wobec drobnoustrojów znajdujących się na fornirze lakierowanym (PWR [%] – 71,2-99,4%) oraz na stali AISI 304 (PWR [%] – 6,6-98,9%). Z kolei najłabszy efekt higienizacyjny osiągnięto na poliamidowej wykładzinie dywanowej (PWR [%] – 4,3-97,4%) i gresie szklwionym (PWR [%] – -2,6-90,9%). Różnice w liczbie reizolowanych bakterii wynikające z różnego pochodzenia szczepu stwierdzono w przypadku *L. monocytogenes* naniesionych na powierzchnię gresu szklwionego i wykładziny dywanowej. Szczep wzorcowy tego gatunku wykazywał istotny statystycznie wyższy współczynnik redukcji w porównaniu ze szczepem klinicznym i środowiskowym (PWR [%], odpowiednio: 66,9% vs. 32,9% i 31,2%), gdy był naniesiony na powierzchnię wykładziny dywanowej i w porównaniu ze szczepem środowiskowym (PWR [%] – 83,1% vs 61,9%), gdy został naniesiony na gres szklwiony. Odwrotną zależność stwierdzono w przypadku szczepu wzorcowego *S. aureus* ATCC 25213, który wykazał istotny statystycznie niższy współczynnik redukcji na gumie w porównaniu do szczepu klinicznego i środowiskowego (PWR [%] - 64,0% vs. 84,8% i 88,5%) oraz na stali w porównaniu do szczepu środowiskowego (PWR [%] - 37,6% vs. 62,7%). Spośród form wegetatywnych bakterii, najwyższe współczynniki redukcji, w przypadku większości badanych powierzchni, uzyskano dla szczepów *A. baumannii*. Ustalony dla nich PWR mieścił się w granicach 89,2 - 99,4%. Najbardziej odporne na działanie RCI, wśród form wegetatywnych bakterii, okazały się szczepy *P. aeruginosa* naniesione na powierzchnię wykładziny dywanowej (PWR [%] – 28,0-66,4%). Badane grzyby drożdżopodobne i pleśniowe naniesione na powierzchnie stali AISI 304 i forniru lakierowanego charakteryzowały się najwyższymi współczynnikami redukcji pod wpływem RCI spośród wszystkich badanych powierzchni (PWR [%] – 86,9-97,3%). Wykazane różnice, w większości przypadków, były istotne statystycznie. Badane szczepy grzybów

C. albicans i *A. niger* wykazywały najwyższą oporność na działanie RCI na powierzchni gumy (PWR [%] = 19,0% i PWR [%] = 36,7%), zaś *P. chrysogenum* na powierzchni wykładziny dywanowej (PWR [%] = 42,2%).

Technologia RCI okazała się skuteczna w ograniczeniu liczby bakterii i grzybów naniesionych w formie zawiesin na powierzchnie użyte w doświadczeniu, przy czym jej skuteczność była zróżnicowana w zależności od rodzaju badanej powierzchni. Może być to związane z ich odmienną strukturą i różnymi właściwościami fizycznymi i chemicznymi. Przeprowadzone badania pozwoliły wykazać, że skuteczność działania RCI zależy nie tylko od uwzględnionych gatunków drobnoustrojów, ale również od szczepu danego gatunku. Znikomą skuteczność ocenianej technologii stwierdzono wobec spor *C. sporogenes*.

Wykazana w powyższych, wstępnych badaniach przeciętna (wśród badanej grupy szczepów) wrażliwość pałeczek *L. monocytogenes* na działanie RCI oraz różnice w oporności szczepów, w zależności od ich pochodzenia były inspiracją do kontynuacji badań, których wyniki opublikowano w publikacji **P3**. W pracy tej badania ukierunkowano na ocenę skuteczności metody RCI wobec różnych szczepów pałeczek *L. monocytogenes* naniesionych w formie planktonicznej i biofilmowej na powierzchnie produktów spożywczych (marchew, filet z łososia, ser miękki typu Camembert) oraz powierzchnie mogące mieć kontakt z żywnością (stal nierdzewna AISI 304, guma, gres, polipropylen). Nowatorskie ujęcie w skali światowej stanowi wykorzystanie technologii RCI do zwalczania biofilmu *L. monocytogenes* wytworzonego na różnych powierzchniach oraz użycie w badaniach powierzchni produktów spożywczych. Takie podejście do zagadnienia ma duży potencjał aplikacyjny, polegający na możliwości zastosowania emiterów RCI na różnych etapach produkcji żywności oraz w magazynach surowca i gotowych produktów spożywczych.

Materiał do badań opisanych w publikacji **P3** stanowiło 6 szczepów *L. monocytogenes* izolowanych z różnych rodzajów żywności: po dwa szczepy pochodzące z mrożonych mieszanek wielowarzywnych, świeżych filetów z łososia oraz sera miękkiego typu Camembert. Szczepy nanoszono na powierzchnie nieożywione w formie mieszaniny zawiesiny bakteryjnej i odpowiedniej pulpy (warzywnej, rybnej lub serowej). Opisane w publikacji **P3** wyniki pozwoliły stwierdzić, że metoda RCI wywołuje inaktywację pałeczek *L. monocytogenes* na powierzchni żywności oraz na powierzchniach nieożywionych, kontaktujących się z żywnością. Efektywność inaktywacji pałeczek *L. monocytogenes* pod wpływem RCI zależy od pochodzenia szczepu oraz właściwości organicznego środowiska rozpraszającego (rodzaj pulpy), formy kontaminacji powierzchni (plankton / biofilm) oraz właściwości

kontaminowanego materiału. Wykazano, że pałeczki *L. monocytogenes* formujące biofilm na wszystkich badanych powierzchniach były mniej podatne na eliminację pod wpływem RCI w porównaniu do komórek naniesionych w postaci planktonicznej. PWR liczby bakterii na powierzchniach wynosił od 24,6 do 99,9% w przypadku zanieczyszczenia planktonicznego oraz od 4,6 do 71,5% dla biofilmu. Wśród większości badanych szczepów *L. monocytogenes* efektywność inaktywacji komórek bakteryjnych pod wpływem RCI była najniższa na powierzchniach badanych fragmentów żywności – odpowiednio 90,8% (forma planktoniczna) i 32,0% (forma biofilmowa) dla izolatów z mieszanek wielowarzywnych; 4,6% (biofilm) dla izolatów z filetów łososia oraz 43,8% (plankton) i 11,2% (biofilm) dla izolatów z sera miękkiego. Wyjątek stanowiły formy planktoniczne szczepów *L. monocytogenes* pochodzących z łososia, wśród których najniższa wartość wskaźnika PWR została osiągnięta na powierzchni polipropylenu (24,6%). Wśród drobnoustrojów naniesionych na badane powierzchnie nieożywione w formie zawiesin, proces eliminacji pałeczek przebiegał najskuteczniej na powierzchni gumy (dla izolatów pochodzących z filetów łososia i sera) oraz stali (dla izolatów z mrożonych mieszanek wielowarzywnych), zaś najmniej efektywnie na powierzchni polipropylenu. W grupie szczepów tworzących biofilm na powierzchniach nieożywionych najwyższą efektywność inaktywacji pałeczek *L. monocytogenes* uzyskano na powierzchniach stali (46,0-71,5%), a następnie gresu (17,9-62,1%), natomiast najniższą na powierzchni polipropylenu (5,3-43,9%). Powyższe wyniki wskazują na duże możliwości aplikacyjne metody RCI w przemyśle spożywczym, szczególnie jako metody uzupełniającej standardowe procedury zapewniania bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności. Na podkreślenie zasługuje fakt, że pewną skuteczność przeciwdrobnoustrojową notowano wobec komórek *L. monocytogenes* w formie biofilmu oraz komórek naniesionych wraz zanieczyszczeniem organicznym, które wywiera istotny wpływ ochronny na drobnoustroje obecne w zakładach przetwórstwa spożywczego.

Kolejnym poważnym problemem związanym z bezpieczeństwem mikrobiologicznym żywności jest możliwość skażenia głębiej położonych warstw surowców, półproduktów lub produktów gotowych oraz skażenie żywności w czasie jej pakowania. Ryzyko jest szczególnie wysokie, gdy poziom skażenia mikrobiologicznego jest niewielki i istnieje możliwość dopuszczenia partii produktu do sprzedaży. W takich produktach, w okresie składowania w magazynach i na półkach sklepowych, może dochodzić do namnażania się drobnoustrojów do poziomu stwarzającego ryzyko rozwoju zakażenia u konsumentów. Szczególne zagrożenie w takiej sytuacji stanowią drobnoustroje psychrotolerancyjne, takie jak pałeczki

L. monocytogenes, które mogą namnażać się również w produktach magazynowanych w warunkach chłodniczych. Rozwiązaniem, zwłaszcza w przypadku żywności specjalnego przeznaczenia, może być higienizacja radiacyjna. Zastosowanie wiązki wysokoenergetycznych elektronów oraz promieniowania gamma w celu inaktywacji pałeczek *L. monocytogenes* we fragmentach łososia przechowywanych w różnych temperaturach opisano w publikacji **P4** wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego:

P4. Skowron K, Grudlewska K, Gryń G, Skowron KJ, Świeca A, Paluszak Z, Zimek Z, Rafalski A, Gospodarek-Komkowska E, 2018: Effect of electron beam and gamma radiation on drug-susceptible and drug-resistant *Listeria monocytogenes* strains in salmon under different temperature. J Appl Microbiol. <https://doi.org/10.1111/jam.13902>

Napromienianie żywności polega na poddaniu jej działaniu promieniowania jonizującego - gamma, X lub wiązki elektronów. Metoda ta ma potwierdzoną skuteczność w zakresie letalnego wpływu na drobnoustroje i, mimo wątpliwości, jakie budzi u konsumentów, znajduje wykorzystanie w stosunku do coraz większej liczby produktów spożywczych – głównie przypraw, owoców, warzyw, ryb, mięsa i owoców morza (Ihsanullah i Rashid, 2017; Roberts, 2014). W zależności od produktu i oczekiwanego efektu napromieniowania stosuje się różne jego dawki. W przypadku dekontaminacji żywności mieszczą się one w zakresie od 1 do 10 kGy (Lung i wsp., 2015; Lacroix, 2014). Źródłem promieniowania gamma, bardzo często wykorzystywanego w celu napromieniania produktów spożywczych, są izotopy ^{60}Co lub ^{137}Cs . Z kolei, wiązka elektronów generowana jest w specjalnie do tego celu zaprojektowanych akceleratorach. Ten typ promieniowania charakteryzuje się mniejszą, niż promiennie gamma, zdolnością do penetracji w głąb materiału, ale dzięki dostarczaniu wyższej dawki promieniowania w jednostce czasu, pozwala na szybsze uzyskanie efektu dekontaminacji (Fan, 2017). Cechą wspólną dla obu tych rodzajów promieniowania jonizującego jest mechanizm ich oddziaływania na komórki drobnoustrojów. Generowana przez nie energia oraz powstające w procesie radiolizy wody rodniki hydroksylowe powodują zmiany w strukturze DNA (uszkodzenia zasad purynowych i pirymidynowych, pęknięcia nici), denaturację enzymów oraz degradację białek i lipidów wchodzących w skład osłon komórkowych. Efektem działania promieniowania gamma i wiązki elektronów, w zależności od zastosowanej dawki, wrażliwości

danego drobnoustroju oraz specyfiki jego środowiska życia, jest poważne uszkodzenie komórki lub jej śmierć (Lung i wsp., 2015; Lacroix, 2014).

Materiał do badań opisanych w publikacji **P4** stanowiły trzy szczepy *L. monocytogenes* izolowane ze świeżych filetów łososia pochodzących z różnych partii surowca. W oparciu o grupę szczepów badanych, wygenerowano subpopulację szczepów *L. monocytogenes* opornych jednocześnie na penicylinę, ampicylinę, meropenem, erytromycynę i kotrimoksazol. Stanowiło to nowatorskie podejście pozwalające na ocenę związku antybiotykooporności badanych szczepów z ich opornością na promieniowanie jonizujące, bez uwzględniania innych różnic między szczepami. Badania dotyczące skuteczności metod eliminacji pałeczek *L. monocytogenes* z żywności w zależności od oporności szczepów na antybiotyki są istotne i aktualne, gdyż zwiększa się udział szczepów lekoopornych izolowanych z produktów spożywczych. Shi i wsp. (2015) izolowali z mrozonek warzywnych, sosów, gotowanego mięsa i pasteryzowanego mleka, 6 szczepów *L. monocytogenes* opornych jednocześnie na ampicylinę, cefalotynę, chloramfenikol, klindamycynę, erytromycynę, gentamycynę, kanamycynę, ryfampicynę, streptomycynę, tetracyklinę i wankomycynę. Gómez i wsp. (2014) oraz Jamali i Thong (2014) wykazali obecność wielolekoopornych szczepów wśród izolatów *L. monocytogenes* pozyskanych z produktów RTE i produktów mięsnych. Uzyskane wyniki badań własnych pozwoliły stwierdzić, że niezależnie od zastosowanego rodzaju promieniowania i temperatury (-20°C, 4°C i 25°C) filetu, wyliczone teoretyczne dawki letalne promieniowania jonizującego były wyższe w przypadku szczepów *L. monocytogenes* z wygenerowaną opornością na antybiotyki niż odpowiednich lekowrażliwych szczepów wyjściowych. Wskazuje to, że badane szczepy wielolekooporne były na ogół mniej wrażliwe na promieniowanie gamma i wiązkę elektronów niż ich lekowrażliwi odpowiedniki. Przeprowadzone badania pozwoliły także porównać skuteczność przeciwdrobnoustrojową wiązki wysokoenergetycznych elektronów i promieniowania gamma wobec pałeczek *L. monocytogenes* we fragmentach filetu z łososia. Analizując parametry opisujące kinetykę inaktywacji pałeczek *L. monocytogenes* na fragmentach filetów łososia stwierdzono, że promieniowanie gamma było bardziej skuteczne w eliminacji tych bakterii niż wiązka wysokoenergetycznych elektronów. W przypadku użycia promieniowania gamma, w zależności od szczepu pałeczek *L. monocytogenes* i temperatury filetu, teoretyczna dawka letalna wahała się od 1,44 (szczep ATCC 19111, temperatura 25°C) do 5,68 kGy (LMO2OP, temperatura -20°C), dawka D₁₀ mieściła się w przedziale od 0,18 (szczep ATCC 19111, temperatura 25°C) do 0,70 kGy (LMO2OP, temperatura -20°C), a współczynnik eliminacji

wynosił od 1,43 (LMO2OP, temperatura -20°C) do 5,56 log j.t.k.×kGy⁻¹ (szczep ATCC 19111, temperatura 25°C). Z kolei dla pałeczek *L. monocytogenes* umieszczonych na fragmentach filetu poddanych działaniu wiązki elektronów, wartości powyższych parametrów mieściły się w następujących przedziałach od 2,99 (szczep ATCC 19111, temperatura 25°C) do 6,83 kGy (LMO2OP, temperatura -20°C), od 0,38 (szczep ATCC 19111, temperatura 25°C) do 0,84 kGy (LMO2OP, temperatura -20°C) i od 1,24 (LMO2W, temperatura -20°C) do 2,62 log j.t.k.×kGy⁻¹ (LMO3W, temperatura 25°C). Z powyższego wynika, że dla danego szczepu *L. monocytogenes* wartości teoretycznych dawek letalnych i dawek D₁₀ były niższe, a współczynników eliminacji wyższe w przypadku użycia promieniowania gamma niż zastosowania wiązki wysokoenergetycznych elektronów. Uzyskane różnice wynikające z typu promieniowania były istotne statystycznie. Otrzymane wyniki pozwoliły wykazać znaczący wpływ temperatury, w jakiej fragmenty filetu z łososia skażone pałeczkami *L. monocytogenes* były poddawane radiacji, na inaktywację tych pałeczek pod wpływem promieniowania. Najważniejszy z parametrów opisujących kinetykę inaktywacji – teoretyczna dawka letalna – w zależności od badanego szczepu *L. monocytogenes*, dla promieniowania gamma, przyjmował wartości: od 2,31 (szczep ATCC 19111) do 3,79 kGy (LMO2OP) w temperaturze -20°C, od 1,78 (szczep ATCC 19111) do 5,68 kGy (LMO2OP) w temperaturze 4°C oraz od 1,44 (szczep ATCC 19111) do 3,02 kGy (LMO2OP) w temperaturze 25°C. Z kolei dla wiązki wysokoenergetycznych elektronów wartości tego parametru wahały się w granicach: od 4,23 (szczep ATCC 19111) do 6,83 kGy (LMO2OP) w temperaturze -20°C, od 3,25 (szczep ATCC 19111) do 5,50 kGy (LMO2OP) w temperaturze 4°C oraz od 2,99 (szczep ATCC 19111) do 5,21 kGy (LMO2OP) w temperaturze 25°C. Wykazano więc, że niezależnie od typu promieniowania, im niższa temperatura, w jakiej fragmenty filetu skażone pałeczkami *L. monocytogenes* poddawano radiacji, tym wyższa teoretyczna dawka letalna była potrzebna do inaktywacji bakterii. Najniższa skuteczność radiacji w warunkach zamrożenia wynika prawdopodobnie z braku możliwości dyfuzji w zamrożonym produkcie wolnych rodników powstających w procesie radiolizy wody i odpowiedzialnych w dużej mierze za destrukcję komórek patogenów (Sommers, 2017). Z technologicznego punktu widzenia istotne znaczenie ma długofalowy wpływ promieniowania na rozwój drobnoustrojów podczas przechowywania produktów spożywczych w warunkach chłodniczych. Wyniki badań Niemira i wsp. (2005) wskazują na początkowe zahamowanie lub obniżenie liczby drobnoustrojów w poddanej radiacji żywności, a następnie ponowne ich namnażanie do poziomu wyjściowego. Dużą rolę odgrywa w tym procesie wysokość dawki promieniowania oraz specyficzne właściwości

produktu. W badaniach opisanych w publikacji **P4** liczebność *L. monocytogenes* wzrastała wraz z upływem czasu składowania filetów poddanych działaniu promieniowania jonizującego. Zastosowanie promieniowania gamma okazało się skuteczniejszą metodą przygotowania filetów do przechowywania w chłodni. W przeciwieństwie do wiązki wysokoenergetycznych elektronów, jego aplikacja skutkowała w przypadku kilku szczepów redukcją liczby ich komórek do poziomu poniżej progu czułości metody. Stan taki utrzymywał się jednak maksymalnie do 20 dnia składowania. Po 35 dniach *L. monocytogenes* izolowano ze wszystkich badanych próbek. Ponowne pojawienie się *L. monocytogenes* w produktach, w których wcześniej ich liczba obniżała się do poziomu uniemożliwiającego potwierdzenie obecności, dowodzi, co najmniej częściowej odwracalności zmian zachodzących w poddanych radiacji komórkach. Najistotniejsze z tych zmian dotyczą destrukcyjnego wpływu promieniowania jonizującego na strukturę DNA bakteryjnego. Przeprowadzona w badaniach własnych ocena powrotu DNA chromosomalnego do wyjściowego wzoru elektroforetycznego w komórkach *L. monocytogenes* oparta na analizie elektroforegramów otrzymanych metodą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (ang. Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE), obrazów mikroskopowych oraz wartości współczynnika opisującego stosunek żywych do martwych komórek w zawieszynie, dowiodła zróżnicowanego tempa tego procesu. W przypadku szczepu LMO2OP, najbardziej opornego na działanie promieniowania jonizującego, trwał on około 24 godzin, bez względu na zastosowany rodzaj promieniowania. Z kolei dla szczepu LMO1W, charakteryzującego się najwyższą wrażliwością na radiację, wymagał od 36 do 40 godzin, przy czym szybciej przebiegał on po napromienieniu wiązką elektronów w dawce 2 kGy niż niższą (1,25 kGy) dawką promieniowania gamma. Uzyskane wyniki potwierdziły wysoką przydatność metod radiacyjnych w eliminacji pałeczek *L. monocytogenes* z żywności. Wykazano ochronny wpływ zastosowanych technik wobec wtórnego namnażania drobnoustrojów w magazynowanych produktach spożywczych. Interesujący okazał się fakt, że narastaniu lekooporności wśród badanych szczepów towarzyszy wzrost oporności na działanie metod radiacyjnych oraz prawdopodobnie usprawnienie mechanizmów naprawczych DNA.

W porównaniu z metodami fizycznymi, częściej są stosowane chemiczne metody inaktywacji pałeczek *L. monocytogenes* i innych drobnoustrojów ze środowiska zakładów przetwórstwa spożywczego. Zagadnienia związane z dezynfekcją chemiczną przedstawione zostały w publikacji **P5** zaliczonej do osiągnięcia naukowego:

P5. Skowron K, Hulisz K, Gryń G, Olszewska H, Wiktorczyk N, Paluszak Z, 2018:
Comparison of selected disinfectants efficiency against *Listeria monocytogenes*
biofilm formed on various surfaces. Int Microbiol. 21:23-33.
<https://doi.org/10.1007/s10123-018-0002-5>

W pracy tej oceniono intensywność tworzenia biofilmu przez trzy szczepy *L. monocytogenes* izolowane z ryb na różnych etapach obróbki na powierzchni folii aluminiowej, gumy, polipropylenu i stali nierdzewnej. Ustalono minimalne stężenie bakteriobójcze (ang. Minimal Bactericidal Concentration, MBC), wobec form planktonicznych i komórek w biofilmie, czterech środków dezynfekcyjnych, które jako substancje czynne zawierały: kwas nadoctowy i nadtlenek wodoru, czwartorzędowe związki amonowe, wodorotlenek sodu oraz podchloryn sodu. Nowym aspektem badawczym opisanym w publikacji **P5** było przedłużenie hodowli na podłożach stałych wykorzystanych do oznaczania MBC do 96 godzin. Wszystkie badane szczepy tworzyły biofilm na powierzchniach testowych. Najwyższą intensywność tworzenia biofilmu stwierdzono na powierzchni folii aluminiowej, a najniższą na gumie. Uzyskane wyniki pozwoliły wykazać zróżnicowaną skuteczność działania środków dezynfekcyjnych w zależności od ich składu chemicznego, czasu kontaktu i rodzaju powierzchni. Zarówno wobec form planktonicznych *L. monocytogenes*, jak i biofilmu, najslabiej skuteczny, niezależnie od czasu kontaktu, okazał się preparat zawierający w swoim składzie wodorotlenek sodu, jako związek aktywny, a najskuteczniejszym dezynfektant na bazie kwasu nadoctowego i nadtlenku wodoru. W przypadku 5-minutowej ekspozycji pałeczek *L. monocytogenes* w formie planktonicznej na dezynfektanty, identyczną wartość MBC ustalono także dla czwartorzędowych związków amoniowych i podchlorynu sodu. Niezależnie od czasu ekspozycji, najmniejszy spadek liczby pałeczek reizolowanych z biofilmu stwierdzono dla większości badanych dezynfektantów w przypadku biofilmu na gumie. Przedłużenie inkubacji hodowli na podłożach stałych wykorzystanych do oznaczania MBC do 96 godzin pozwoliło wykazać, że niektóre szczepy *L. monocytogenes* mogą przeżyć proces dezynfekcji w postaci komórek z nieletalnymi uszkodzeniami, które wymagają czasu na regenerację i wzrost. Zjawisko to może odgrywać istotną rolę w narastaniu oporności *L. monocytogenes* na dezynfektanty.

4.3.4. Najważniejsze wyniki przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego

1. Wykazanie, przy wykorzystaniu metody PFGE, stanowiącej złoty standard, że głównym źródłem pałeczek *L. monocytogenes* w zakładzie przetwórstwa rybnego jest surowiec pochodzący z ferm rybnych.
2. Stwierdzenie obecności w surowcu rybnym i w środowisku przetwórstwa rybnego, prawdopodobnie po raz pierwszy w Europie, wielolekoopornych szczepów *L. monocytogenes* niewrażliwych na penicylinę, ampicylinę, meropenem, erytromycynę i kotrimoksazol. Wskazuje to na istotne zagrożenie dla zdrowia konsumentów i może stwarzać poważne trudności terapeutyczne w przypadku rozwoju zakażenia o tej etiologii w populacji ludzkiej.
3. Udowodnienie skuteczności technologii RCI w ograniczaniu poziomu mikrobiologicznego skażenia powietrza w pomieszczeniach w oparciu o wyniki, prawdopodobnie pierwszego badania na świecie, przeprowadzonego na zróżnicowanej gatunkowo grupie szczepów wzorcowych, obejmującej zarówno bakterie Gram-dodatnie, w tym przetrwalnikujące, jak i Gram-ujemne, a także grzyby pleśniowe i drożdżoidalne.
4. Wykazanie, po raz pierwszy w świecie, możliwość zastosowania metody RCI w zakładach przetwórstwa spożywczego w celu eliminacji pałeczek *L. monocytogenes* z powierzchni ożywionych (produkty spożywcze) i nieożywionych, w tym zanieczyszczonych materią organiczną.
5. Udowodnienie, po raz pierwszy w skali światowej, przydatności metody RCI do eradykacji biofilmu *L. monocytogenes* z powierzchni ożywionych (produkty spożywcze) i nieożywionych w zakładach przetwórstwa spożywczego.
6. Stwierdzenie wyższej oporności antybiotykoopornych szczepów *L. monocytogenes* na radiacyjne metody higienizacji żywności w oparciu o badania nad subpopulacją szczepów lekoopornych wygenerowaną z populacji wyjściowej.
7. Wykazanie, że lekooporność szczepów *L. monocytogenes* i rodzaj użytego promieniowania jonizującego wpływa na czas potrzebny do zajścia procesu powrotu DNA chromosomalnego do wyjściowego wzoru elektroforetycznego.
8. Jednoznaczne udokumentowanie wpływu temperatury magazynowania filetów z łososia na wielkość dawek promieniowania jonizującego potrzebnych do inaktywacji drobnoustrojów.

9. Potwierdzenie, że skuteczność działania środków dezynfekcyjnych zależy od ich składu chemicznego, czasu kontaktu pałeczek *L. monocytogenes* z preparatem oraz rodzaju dezynfekowanej powierzchni.
10. Ustalenie, że wydłużenie czasu inkubacji w procedurze oznaczania MBC dezynfektantów, prawdopodobnie pozwala pałeczkom *L. monocytogenes* na procesy naprawcze i wzrost w stężeniach środków dezynfekcyjnych, które po 24 godzinach były traktowane, jak wartości MBC dla danego szczepu.

4.3.5. Perspektywy badawcze związane z osiągnięciem naukowym

Planowane jest kontynuowanie tematyki badawczej przedstawionej w publikacjach składających się na osiągnięcie naukowe.

Szczególny nacisk zostanie ukierunkowany na dalsze badania nad technologią RCI. W trakcie realizacji jest eksperyment mający na celu określenie wpływu warunków środowiska (czasu ekspozycji, odległości od emitera, itp.) na skuteczność metody RCI wobec pałeczek *L. monocytogenes* i innych gatunków drobnoustrojów związanych z żywnością na różnych rodzajach powierzchni. Dzięki współpracy z Katedrą Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu prowadzone są badania zmierzające do oceny wpływu technologii RCI na inwazyjność *L. monocytogenes* wobec linii komórek gruczolakoraka jelita grubego (HT-29) oraz na ekspresję genów kodujących wybrane czynniki wirulencji, a także intensywność tworzenia biofilmu i tempo metabolizmu. Z kolei, we współpracy z Katedrą Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu planowane są badania nad wpływem technologii RCI na wybrane komórki eukariotyczne.

Przewidywane jest także podjęcie badań mających na celu wyjaśnienie związku pomiędzy lekoopornością szczepów *L. monocytogenes* a wzrostem oporności na działanie promieniowania jonizującego oraz skrócenie czasu potrzebnego na naprawę poradiacyjnych uszkodzeń DNA. Planuje się także określenie i zbadanie mechanizmów naprawczych DNA u *L. monocytogenes* i ich podłoża genetycznego.

W aspekcie dezynfekcji chemicznej realizowane są aktualnie badania mające na celu określenie wpływu warunków środowiska, w jakich powstaje biofilm *L. monocytogenes* na jego podatność na działanie dezynfektantów. Ponadto, zakończone zostały badania porównujące skuteczność roztworów roboczych dezynfektantów przygotowanych z wykorzystaniem wody ozonowanej i nieozonowanej.

5 Omówienie zainteresowań naukowo-badawczych i pozostałych osiągnięć

Moje dotychczasowe zainteresowania badawcze, oprócz tematyki ujętej w pracach składających się na osiągnięcie naukowe, skupiają się głównie na trzech zagadnieniach:

- ocenie czystości mikrobiologicznej środowiska związanego z produkcją zwierzęcą,
- metodach higienizacji odpadowej materii organicznej i nawozów naturalnych pochodzenia zwierzęcego,
- biofilmach bakteryjnych i wpływie różnych czynników na intensywność ich tworzenia i eradykację.

Mikroflora środowiska hodowlanego jest jednym z głównych czynników wpływających na zdrowotność zwierząt oraz pracowników obsługi.

Drobnoustroje występujące w budynkach inwentarskich, mogą wchodzić w skład bioaerozolu i rozprzestrzeniać się za pośrednictwem powietrza. Skład ilościowy i gatunkowy bioaerozolu uzależniony jest od obsady i gatunków zwierząt, ich stanu zdrowia, systemu utrzymania i żywienia oraz warunków mikroklimatycznych (Kristiansen i wsp., 2012; Popescu i wsp., 2014). W powietrzu budynków inwentarskich najczęściej występują przedstawiciele rodzajów: *Bacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, grupy *coli* oraz *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* i *Candida* (Kończak i Dobrzański, 2006). Aspekty związane z jakością mikrobiologiczną powietrza zostały przedstawione w publikacjach **IID.5***, **IID.7** i **IID.12**, których jestem współautorem. Badania opisane w publikacji **IID.5** wykazały, że liczba i skład gatunkowy mikroflory uzależniony jest od wielkości i składu gatunkowego oraz wiekowego obsady zwierząt. Najwyższy poziom zanieczyszczenia mikrobiologicznego powietrza występował przy kojcach tuczników, warchlaków i bukatów, a najniższy przy kójcu cieląt. Badania te potwierdziły także znaczne sezonowe wahania poziomu zanieczyszczenia mikrobiologicznego powietrza w budynkach inwentarskich. Najwyższe skażenie odnotowano w lutym i marcu, a najniższe w okresie od lipca do września. Z kolei w powietrzu obory dla krów mlecznych najwięcej bakterii izolowano w październiku, a najmniej w styczniu (**IID.12**). Poziom zanieczyszczenia mikrobiologicznego powietrza w budynkach inwentarskich jest zróżnicowany w zależności od miejsca poboru prób. Z reguły najwięcej drobnoustrojów jest izolowanych w centralnej części budynku (**IID.7**). Przeprowadzone badania nie wykazały znaczącego wpływu modernizacji chlewni i przejścia na bezściołowy system utrzymania na

* Oznaczenia publikacji zgodne z numeracją w załączniku 6 (Wykazie dorobku według wzoru CK)

liczebność i skład gatunkowy mikroflory izolowanej z powietrza (IID.7). Istotnym źródłem drobnoustrojów w powietrzu budynków inwentarskich są odchody zwierząt. Badania własne (IID.8, IID.9) wykazały, że kał trzody chlewnej może zawierać znaczą liczbę grzybów drożdżoidalnych i pleśniowych. Liczba grzybów izolowanych z odchodów była najwyższa w przypadku prosiąt, a najniższa w przypadku warchlaków. Zróżnicowanie gatunkowe, zarówno pleśni, jak i drożdżaków, było największe w kale tuczników (IID.8, IID.9).

Oprócz drogi aerogennej, w pomieszczeniach inwentarskich istnieje szereg innych dróg transmisji drobnoustrojów. Badania nad występowaniem i rozprzestrzenianiem się wrażliwych lub opornych na wankomycynę enterokoków w środowisku chlewni zostały opisane w publikacji IIA.19. W pracy tej wykazano zróżnicowanie gatunkowe enterokoków w badanej chlewni. W większości sektorów produkcyjnych dominował gatunek *Enterococcus hirae*, w obrębie którego zidentyfikowano dwa odrębne genetycznie szczepy odporne na wankomycynę w stężeniu $6 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$, o fenotypie VanC₁. Typ VanC₁ nie ulega horyzontalnemu transferowi genów, a więc ma ograniczoną zdolność dystrybucji w środowisku hodowlanym. Uzyskane wyniki sugerują, że głównymi drogami rozprzestrzeniania się szczepów enterokoków mogą być koryta zanieczyszczone odchodami zwierząt, skażona pasza, przenoszenie przez sprzedawane tuczniki przepędzane na rampę lub transmisja na obuwiu personelu.

Prowadzony chów i hodowla oddziałują nie tylko na skład mikroflory wewnątrz budynków inwentarskich, ale także na otaczające środowisko. Wykazano (IID.4), że staw karpiovy wpływa na mikroflorę otaczających go wód powierzchniowych. Stwierdzono, że zrzut wody ze stawu powodował nieznaczny wzrost liczby drobnoustrojów w lokalnej rzece, do której te wody były odprowadzane.

W ramach drugiego obszaru zainteresowań badawczych, zajmuję się głównie zagadnieniem skuteczności metod higienizacji gnojowicy oraz biobezpieczeństwem jej rolniczego zastosowania. Tematyka ta stanowiła również podstawę mojej pracy magisterskiej i doktorskiej. W ciągu ostatnich kilku dziesięcioleci produkcja zwierzęca staje się coraz bardziej intensywna (Ledakowicz i Krzystek, 2005). Wiąże się to z deponowaniem w środowisku dużej ilości odchodów, stanowiących potencjalne zagrożenie sanitarno-higieniczne i ekologiczne (Watabe i wsp., 2003). Nie bez znaczenia dla środowiska, a pośrednio także dla zdrowia ludzi, pozostaje fakt przejścia od chowu ściółkowego do bezściółkowego i związane z tym zastąpienie obornika gnojowicą (Bohdziewicz i Kuglarz, 2009; Watabe i wsp., 2003), która jest znacznie trudniejsza do zagospodarowania i nie podlega samoodkażaniu. Sytuacja ta przyczyniła się do wydłużenia przeżywalności drobnoustrojów obecnych

w odchodach oraz zwiększenia prawdopodobieństwa transmisji patogenów na inne zwierzęta oraz ludzi (Venglovsky i wsp., 2009). Na mikroflorę gnojowicy składają się wirusy, bakterie, grzyby oraz pasożyty. Dominującą grupą w tym zespole organizmów są bakterie, zarówno saprofityczne, jak i patogenne (Olszewska i wsp., 1997). Łączna liczba bakterii tlenowych lub względnie beztlenowych waha się w granicach od 10^9 do 10^{10} komórek w 1 cm^3 gnojowicy (Paluszak, 1998). Pod koniec lat 70. XX wieku została opracowana przez Grupę Ekspertów Wspólnoty Europejskiej lista obejmująca bakterie, których pojawienie się w gnojowicy może stanowić poważne zagrożenie dla ludzi i zwierząt w warunkach europejskich (Strauch, 1991). Należą do nich: *Brucella* spp., *Chlamydia* spp., *Escherichia coli* (enteropatogenne szczepy odporne na antybiotyki), *Leptospira* spp., *Rickettsia* spp., *Salmonella* spp., *Treponema hyodysenteriae*, *Bacillus anthracis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Mycobacterium* spp. (np. *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium-complex*). Uzasadnione jest twierdzenie, że w gnojowicy może występować każdy drobnoustrój, który wraz z odchodami został wydalony z organizmu zwierzęcia. Z tego względu w nawozie tym stwierdzane są sporadycznie bakterie takie, jak: *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* oraz bakterie z rodzaju *Campylobacter*. W związku z powyższym istotna jest ocena skuteczności metod higienizacji gnojowicy przeznaczonej na cele rolnicze, by przerwać drogi transmisji drobnoustrojów i nie dopuścić by stwarzały zagrożenie dla ludzi.

Charakterystyka podstawowych metod obróbki gnojowicy w aspekcie biobezpieczeństwa jej rolniczego zagospodarowania została przedstawiona w poglądowej publikacji **IIA. 17**.

Składowanie gnojowicy jest najprostszą oraz najtańszą metodą obróbki tego nawozu. Z tego względu stosowane jest znacznie częściej niż inne metody uzdatniania gnojowicy na cele rolnicze. Głównymi czynnikami ograniczającymi jego skuteczność są temperatura i czas składowania (**IIA.17**). Właściwości fizyko-chemiczne gnojowicy powodują, że w trakcie składowania nie ulega ona samozagrzaniu, co sprawia, że nie jest generowana ilość ciepła niezbędna do biotermicznego samoodkażania i wyraźnie ogranicza intensywność higienizacyjną procesu składowania (**IIA. 17**). Składowanie jest metodą obróbki gnojowicy, w czasie której nie są podejmowane żadne aktywne metody stabilizacji tego nawozu, z wyjątkiem stosowanego niekiedy mieszania płynnych odchodów. Metoda ta wykorzystuje brak zdolności większości bakterii patogennych i pasożytów do namnażania się poza organizmem gospodarza. Ponadto, drobnoustroje podlegają naturalnej stopniowej eliminacji w czasie składowania. Ich przeżywalność podczas tego procesu jest dość zróżnicowana i może

być liczona w tygodniach lub miesiącach (**IIA.17**). Inaktywacja drobnoustrojów w czasie składowania jest możliwa pod warunkiem, że nie są wprowadzane nowe porcje gnojowicy, stanowiące źródło składników odżywczych oraz kolejnych drobnoustrojów (**IIA.17**). Zagadnienie składowania gnojowicy zostało poruszone w kilku pracach (**IIA.8, IID.2, IID.6, IID.14**). Wykazano w nich, że na przeżywalność bakterii w składowanej gnojowicy wpływa wiele czynników. Najważniejszym z nich jest temperatura. Udokumentowano, że proces znacznie skuteczniej zachodził w temperaturze 20°C niż 4°C (**IIA.8, IID.2, IID.6, IID.14**). Kolejnym czynnikiem jest udział suchej masy w gnojowicy. Stwierdzono, że bakterie przeżywają znacznie dłużej w gnojowicy o wyższej zawartości suchej masy, co sugeruje jej wpływ ochronny (**IIA.8**). Wykazano, że typ gnojowicy wpływa na czas utrzymywania się w niej bakterii. Przeżywały one dłużej w gnojowicy bydłowej niż świńskiej (**IID.14**). Gatunek drobnoustrojów również decyduje o ich przeżywalności. Stwierdzono, że najkrócej przeżywały pałeczki *Salmonella* spp., a najdłużej enterokoki (**IIA.8, IID.2, IID.6, IID.14**).

Kolejną, coraz częściej stosowaną, metodą higienizacji gnojowicy jest poddanie jej fermentacji metanowej. Proces ten opiera się na współdziałaniu licznych grup drobnoustrojów. Pierwszą grupę stanowią bakterie hydrolizujące, uczestniczące w procesie hydrolizy i powodujące rozkład polimerycznych związków organicznych (białka, tłuszcze i węglowodany) do substancji prostszych (aminokwasy, peptydy i cukry proste). Do drugiej grupy należą bakterie hydrolizujące kwasogenne, które uczestniczą w kwasogenezie i powodują hydrolityczny rozkład aminokwasów, peptydów i cukrów prostych do kwasów tłuszczowych, kwasów organicznych, alkoholi, aldehydów i ketonów. Trzecią grupą są bakterie octanogenne wytwarzające octany z wykorzystaniem węgla i energii z produktów kwasogenezы (syntrofy bakterii metanogennych) lub z CO₂ i H₂ (bakterie homoocetanogenne). Czwartą grupę stanowią metanogenne archaeabakterie wiążące CO₂ i H₂ z wytworzeniem CH₄ i H₂O lub rozkładające octany do CH₄ i CO₂ (**IIA.17**). Fermentacja metanowa gnojowicy może być prowadzona w warunkach mezofilnych lub termofilnych oraz sporadycznie w psychrofilnych (**IIA.17**). Na przeżywalność bakterii w czasie fermentacji wpływa szereg czynników, do których należą: czas hydraulicznej retencji, stężenie lotnych kwasów tłuszczowych, pH, temperatura oraz typ gnojowicy, zawartość suchej masy i typ procesu fermentacji (**IIA.17**). W publikacji **IID.23** opisano wpływ procesu termofilnej fermentacji metanowej, prowadzonej w skali technicznej, na przeżywalność pałeczek *Salmonella* Senftenberg oraz inwazyjność jaj *Ascaris suum*. W badaniach własnych wykazano, że fermentacja metanowa skutecznie eliminuje bakterie i pasożyty, nawet przy bardzo wysokim wyjściowym poziomie skażenia

gnojowicy. Całkowitą eliminację pałeczek *S. Senftenberg* uzyskano w ciągu 12 godzin, a inaktywację jaj *A. suum* po 4 godzinach (II D.23). Z kolei czas potrzebny do wyeliminowania pałeczek *Salmonella* spp. z gnojowicy poddanej mezofilnej fermentacji był dłuższy i wynosił kilka dni (II A.5). W badaniach własnych (II A.5) wykazano, że przeżywalność pałeczek *Salmonella* spp. podczas fermentacji zależy od ich serotypu. Wyliczony teoretyczny czas eliminacji tych pałeczek wahał się od 3,9 dnia dla *S. Typhimurium* do 9,5 dnia dla *S. Senftenberg*.

W powyższej pracy (II A.5) opisano także skuteczność kolejnej metody higienizacji gnojowicy – napowietrzania drobnopęcherzykowego. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że chociaż ta metoda jest skuteczna w eliminacji pałeczek *Salmonella* spp., to jej efektywność jest niższa niż w przypadku mezofilnej fermentacji metanowej (II A.5). Wyliczony teoretyczny czas eliminacji tych pałeczek w trakcie napowietrzania wahał się od 7,2 dnia dla *S. Typhimurium* do 10 dni dla *S. Senftenberg*. Proces napowietrzania polega na wprowadzaniu do gnojowicy drobnych pęcherzyków powietrza w celu przyspieszenia procesu jej stabilizacji poprzez mikrobiologiczne utlenianie zawartych w tym nawozie substancji organicznych. Procesy mikrobiologiczne, zachodzące podczas napowietrzania prowadzą do utleniania związków węgla z wytworzeniem energii. Jej część wykorzystywana jest w procesie namnażania bakterii, natomiast 45-50% jest wydzielane w postaci ciepła. Może to prowadzić do samozagrzewania się tego nawozu do temperatury w granicach 55-70°C (II A.17).

Oprócz metod biologicznych uzdatniania gnojowicy istnieją także metody fizyczne, które również były przedmiotem moich zainteresowań badawczych. W pracach (II A.7, II A.11) z tego zakresu, skupiono się nad możliwościami wykorzystania do celów higienizacji gnojowicy wiązki wysokoenergetycznych elektronów. Przeprowadzone badania dowiodły wysokiej skuteczności higienizacyjnej wiązki wysokoenergetycznych elektronów, zarówno wobec badanych bakterii (*Salmonella* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*), jak i jaj pasożytów żołądkowo-jelitowych (*A. suum*). Stwierdzono, że w większości przypadków dawka o mocy 7 kGy jest wystarczająca do całkowitej higienizacji gnojowicy, przy czym dawki rzędu 2-3 kGy dają satysfakcjonujące efekty porównywalne z uzyskiwanymi w trakcie kilkunastu dni realizacji procesu fermentacji metanowej lub napowietrzania drobnopęcherzykowego w warunkach mezofilnych. Zaznaczyć należy, że już dawka poniżej 1 kGy w każdym z rozpatrywanych przypadków pozwoliła osiągnąć 90% redukcję populacji badanych drobnoustrojów. Przeprowadzone badania wykazały zróżnicowaną przeżywalność badanych drobnoustrojów w zależności od gatunku, a nawet serotypu (II A.7). Stwierdzono niższą

skuteczność opisanej metody w stosunku do spor *C. sporogenes*, dla których teoretyczna dawka letalna wynosiła 11,6 kGy oraz parwowirusa bydłęcego - 23,5 kGy (**IIA.11**). Dowiedziono ochronnego działania suchej masy oraz wpływu typu odchodów na przeżywalność (**IIA.7**), o czym trzeba pamiętać aplikując higienizację radiacyjną do praktycznych zastosowań.

Prowadzenie badań, często w skali technicznej, wymaga opracowania możliwości kontrolowanej kontaminacji gnojowicy w zbiorniku, z zapewnieniem bezpieczeństwa wsadu. Jednym z możliwych rozwiązań jest stosowanie odpowiednich nośników, np. nośników typu Filter-Sandwich. Przeprowadzone badania (**IID.15**) pozwoliły stwierdzić, że nośniki typu Filter-Sandwich okazały się przydatne w systemie ciągłego monitorowania efektywności higienizacyjnej procesów uzdatniania gnojowicy, a wykazane różnice w końcowych wartościach wybranych parametrów fizyko-chemicznych gnojowicy pochodzącej z reaktora i z nośników były małe i wskazywały, że konstrukcja nośnika zapewnia możliwość oddziaływania środowiska zewnętrznego na badane drobnoustroje. Nie stwierdzono wpływu ochronnego nośników Filter-Sandwich na umieszczone w nich bakterie, skutkującego wydłużeniem ich przeżywalności w stosunku do próbek objętościowych, ani nie stwierdzono skażenia jałowej gnojowicy drobnoustrojami pochodzącymi z umieszczonych w niej nośników (**IID.15**).

W kręgu moich zainteresowań badawczych znalazły się zagadnienia związane z możliwością skażenia gleb przez niewłaściwie higienizowaną gnojowicę. Przeprowadzone badania (**IID.1**) wykazały, że wprowadzone wraz z gnojowicą pałeczki *E. coli* ulegały szybszej eliminacji w temperaturze 20°C niż 4°C. Najdłuższą przeżywalność stwierdzono w przypadku badanych pałeczek w glebie biellicowej o 60% wysyceniu pojemności wodnej, a najkrótszą w glebie biellicowej i czarnej ziemi o 30% wysyceniu wilgocią (**IID.1**). Jaja *A. suum*, wprowadzone do gleby w wyniku zastosowania niez higienizowanej gnojowicy stanowią poważny problem sanitarny. Jaja te zachowują inwazyjność nawet przez kilkadziesiąt tygodni (**IIA.15**). W przeprowadzonych badaniach, inwazyjne jaja *A. suum* izolowano najdłużej z gleby biellicowej, w temperaturze 4°C (100,8 tygodnia), a najkrócej z czarnej ziemi zbrunatniałej, w 20°C (40,1 tygodnia).

W aspekcie higienizacji materii organicznej byłem członkiem zespołów prowadzących badania dotyczące higienizacji osadów ściekowych poprzez ich kompostowanie (**IIA.2, IIA.4, IID.3**) oraz poddawanie suszeniu w suszarniach słonecznych (**IIA.6, IID.16**). Badałem wpływ zastosowania ługu sodowego na przeżywalność drobnoustrojów w ściekach (**IIA.3, IID.11**). Uczestniczyłem w doświadczeniach, mających na celu sprawdzenie przydatności

promieniowania UV-C i mikrofalowego w procesie higienizacji mączek rybnych (**IID.17**, **IIA.13**) oraz skuteczności tlenku wapnia w eliminacji spor *C. sporogenes* z odpadów mięsnych (**IIA.14**). Brałem udział w badaniach skuteczności dodatku komponentu mikrobiologicznego na procesy higienizacji i ograniczania uciążliwości zapachowej odpadów komunalnych (**IIA.1**, **IIA.10**).

Trzecim, z głównych obszarów mojej działalności naukowej, są badania nad biofilmami bakteryjnymi oraz metodami ich zwalczania. Drobnoustroje w środowisku naturalnym częściej występują w skupiskach zwanych biofilmem niż w postaci pojedynczych, rozproszonych komórek, tzw. planktonu. Drobnoustroje występujące w tej formie mają łatwiejszy dostęp do substancji odżywczych i wykazują większą oporność na czynniki fizyczne i chemiczne. Struktury występujące na powierzchni komórek, np. rzęski czy fimbrie oraz wytwarzane substancje zewnątrzkomórkowe, tzw. EPS (ang. extracellular polymeric substances), sprzyjają jego formowaniu (Jamal i wsp., 2018). Do jego tworzenia może dochodzić w środowisku naturalnym, np. w zbiornikach wodnych, w organizmach żywych, jak również na powierzchni biomateriałów wykorzystywanych w medycynie lub w zakładach przetwórstwa żywności, co jest związane z właściwościami adhezyjnymi drobnoustrojów (Hall-Stoodley i wsp., 2004). Powstawanie biofilmu jest zjawiskiem wieloetapowym, który jest zależny od właściwości tworzących go drobnoustrojów oraz rodzaju kolonizowanych materiałów. Biofilm to złożona i wielokomórkowa struktura, w której skład mogą wchodzić komórki jednego lub wielu gatunków drobnoustrojów (bakterii i/lub grzybów), a także substancje organiczne. W konsekwencji powstaje złożony ekosystem. W procesie tworzenia biofilmu wyróżnia się fazy: adhezji odwracalnej, adhezji nieodwracalnej, dojrzewania biofilmu oraz jego dyspersji (Jamal i wsp., 2018). Komórki bakteryjne w strukturze biofilmu są bardziej odporne na substancje biobójcze, w tym na antybiotyki i na dezynfektanty (Poimenidou i wsp., 2016). Niedobór składników pokarmowych w środowisku, nieodpowiednie pH czy temperatura są czynnikami promującymi tworzenie biofilmu. Bakterie w formie biofilmu są przyczyną około 70% zakażeń bakteryjnych (Maciejewska i wsp., 2016). Drobnoustroje tworząc biofilm mogą wewnątrz niego namnażać się i różnicować architekturę tej struktury, tworząc różnorodne kształty (np. grzyba, słupów), przedzielone kanałami, którymi „dopływają” składniki odżywcze, a usuwane są poza biofilm produkty metabolizmu. Dochodzi do aktywacji lub „uśpienia” ekspresji niektórych genów, a także do zmian fenotypowych komórek, w zależności od tego w jakiej warstwie biofilmu się znajdują. Komórki w głębszych warstwach biofilmu są bardziej wirulentne, a ze względu na ograniczony dostęp tlenu, ich metabolizm staje się

beztlenowy. W porównaniu do komórek z zewnętrznych warstw, są mniejsze, wzrastają wolniej lub pozostają w stanie uśpienia. Między komórkami w biofilmie może dochodzić do wymiany materiału genetycznego i nabywania specyficznych cech (Kołwzan, 2011). W pracy **IIA.16** wykazano, że intensywność tworzenia biofilmu przez szczepy *Proteus mirabilis* zależy od właściwości danego szczepu i dokładności zastosowanej metody wykrywania. Metoda ilościowa z chlorkiem 2,3,5-trifenylo-tetrazoliowym pozwala na większe zróżnicowanie szczepów pod względem intensywności tworzenia biofilmu w porównaniu z ilościowym testem przy użyciu fioletu krystalicznego. Stosując metodę jakościową z fioletem krystalicznym, większą liczbę badanych szczepów klasyfikuje się jako silnych producentów biofilmu w porównaniu z oznaczeniem z użyciem chlorku 2,3,5-trifenylo-tetrazoliowego. Spowodowane jest to prawdopodobnie niespecyficznym barwieniem innych składowych biofilmu (**IIA.16**). Ze względu na istotną rolę biofilmów bakteryjnych w zakażeniach, ważnym problemem jest dobór odpowiednich stężeń antybiotyków stosowanych w eradykacji biofilmu. Tworzenie biofilmu, z reguły, istotnie zwiększa oporność komórek bakteryjnych na działanie antybiotyków, co znacznie utrudnia leczenie zakażeń związanych z biofilmem. W pracy **IIA.18** został oceniony wpływ ciprofloksacyny na biofilm *Proteus* spp. Wykazano, że wartości minimalnego stężenia eradykującego biofilm (ang. Minimum Biofilm Eradication, MBE) ciprofloksacyny są zbliżone do wartości MIC, co może wskazywać na skuteczność tego antybiotyku w leczeniu zakażeń związanych z biofilmem, szczególnie o etiologii *P. vulgaris*. Niewielkie różnice w wartościach MBE i MIC ciprofloksacyny można wyjaśnić dobrą penetracją tego antybiotyku do biofilmu *P. vulgaris*. Biofilm szczepów *P. mirabilis* wyizolowanych z moczu jest bardziej odporny na ciprofloksacynę niż biofilm wytworzony przez szczepy pochodzące z wymazów z ran. W kolejnej pracy **IIA.9** oceniono wpływ subinhibicyjnych stężeń ciprofloksacyny i ceftazydymu na biofilm *P. mirabilis* o różnej dojrzałości. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że zarówno ciprofloksacyna, jak i ceftazydym eradykują biofilm wytworzony przez *P. mirabilis*, co odzwierciedla spadek mediany absorbancji wraz z rosnącym stężeniem leków. Wykazano wpływ stopnia dojrzałości biofilmu i rodzaju materiału, z którego izolowano szczepy na działanie antybiotyków. W przeprowadzonym doświadczeniu stwierdzono zróżnicowany wpływ obu badanych antybiotyków na biofilm. W biofilmie 12-godzinnym, przy wartościach subMIC wynoszących 0,125 i 0,250 MIC wyższe mediany absorbancji (0,8029 i 0,4634 - dla szczepów wyosobnionych z moczu oraz 0,6292 i 0,3407 - dla szczepów wyhodowanych z wymazów z rany) stwierdzono w przypadku ciprofloksacyny niż ceftazydymu (odpowiednio 0,4548

i 0,2753 oraz 0,5236 i 0,3703). Z kolei przy wartościach subMIC równych 0,5 i 1,0 MIC uzyskano wyniki odwrotne (**IIA.9**). Znajomość wpływu stężeń subMIC antybiotyku na drobnoustroje tworzące biofilm może okazać się przydatna w racjonalnej antybiotykoterapii. W czasie antybiotykoterapii część drobnoustrojów podlega działaniom dawek subinhibicyjnych. Znajomość ich wpływu na biofilm tworzony przez różne drobnoustroje, a także wskaźniki farmakodynamiczne leku mogą okazać się pomocne w zwalczaniu zakażeń związanych z biofilmem (**IIA.9**).

Narastanie oporności na antybiotyki oraz ich nadużywanie w różnych sektorach, czyni celowym poszukiwanie alternatywnych metod zwalczania drobnoustrojów. Jedną z nich jest stosowanie substancji pochodzenia naturalnego, takich jak propolis. W badaniach dotyczących wpływu etanolowego ekstraktu propolisu (ang. Ethanolic Extract of Propolis, EEP) (**IIA.22**) wykazano, że EEP w stężeniach 25-100 mg/ml powoduje ograniczenie liczby komórek *P. mirabilis* w tworzącym się i dojrzałym biofilmie. Stwierdzono, że antyseptyki, takie, jak Octenisept® (dichlorowodorek octenidyny) i Prontosan® (biguanidyna poliaminopropylu) są bardziej skuteczne niż EEP w ograniczaniu formowania biofilmu. W przypadku dojrzałego biofilmu skuteczność EEP przy pojedynczym i podwójnym rozcieńczeniu była porównywalna do Prontosanu® (**IIA.22**). Jak wcześniej wspomniano, biofilm stwarza istotne zagrożenie nie tylko w zakażeniach, ale także na skutek powstawania na różnych powierzchniach, związanych, np. z przetwórstwem spożywczym. Właściwości i oporność biofilmu na działania przeciwdrobnoustrojowe zależą nie tylko od jego składu gatunkowego i dojrzałości, ale także od warunków, w jakich powstaje. Uwagę na ten problem zwrócono w pracach **IID.21** i **IID.25**. W publikacji **IID.21** oceniono wpływ dodatku 0,5 i 10% NaCl na tworzenie biofilmu *L. monocytogenes* na stali nierdzewnej AISI 304. W badaniach tych wykazano, że pałeczki *L. monocytogenes* tworzyły biofilm na stali nierdzewnej nawet w przypadku wysokiego zasolenia środowiska. Stężenie chlorku sodu wpływa, u tego gatunku, na intensywność tworzenia biofilmu, przy czym proces ten najlepiej zachodzi przy stężeniu NaCl wynoszącym 5%. Wykazano, że poddanie pałeczek *L. monocytogenes* wstępnemu stresowi osmotycznemu skutkowało wzrostem intensywności tworzenia biofilmu, szczególnie przy najwyższym zasoleniu, tj. 10% NaCl (**IID.21**). Z kolei badania przeprowadzone w ramach pracy **IID.25** dowiodły, że dodatek krwi owczej w stężeniu do 20% spowodował wzrost liczby komórek *L. monocytogenes* odzyskanych z biofilmu dla wszystkich badanych szczepów. Natomiast zwiększenie zawartości krwi w podłożu do 50% skutkowało zwiększeniem intensywności tworzenia biofilmu tylko w przypadku szczepu izolowanego z krwi (**IID.25**).

Poza głównymi zainteresowaniami naukowymi, w trakcie pracy zawodowej, brałem udział w kilku innych badaniach dotyczących skuteczności przeciwgrzybiczej pochodnych tiazoli (**IIA.12**), skuteczności przeciwdrobnoustrojowej różnych środków dippingowych (**IIA.21**), lekowrażliwości i wirulencji szczepów *E. coli* izolowanych od kobiet ciężarnych i noworodków oraz z odbytu i pochwy (**IIA.20**, **IIA.23**), czystości kosmetyków (**IID.24**), skuteczności sterylizatorów mikrofalowych (**IID.22**), czystości mikrobiologicznej powietrza w budynkach uczelni (**IID.18**), mykoflory dziobów i kloak piskląt bociana białego (**IID.13**) oraz poziomu gospodarki żelazowej w surowicy krwi warchlaków (**IID.10**). Jestem także współautorem dwóch prac poglądowych (**IID.19** i **IID.20**) dotyczących istotnego problemu w ochronie zdrowia, jakim są zakażenia o etiologii *Clostridium difficile* i ich leczenie.

6 Podsumowanie dorobku naukowego

Efektem mojej dotychczasowej działalności naukowej jest **58** publikacji, w tym **50** prac oryginalnych, **3** publikacje poglądowe, **2** rozdziały w monografiach oraz **3** publikacje branżowe i popularno-naukowe. Spośród wymienionych prac, **28** to publikacje w czasopismach z listy JCR (4 przed i 23 po uzyskaniu stopnia doktora), a **30** to prace opublikowane w czasopismach spoza listy JCR (11 przed i 19 po uzyskaniu stopnia doktora). W **20** publikacjach jestem pierwszym autorem. Szczegółową analizę bibliometryczną dorobku publikacyjnego i pozapublikacyjnego przedstawiłem w tabelach 1 i 2. Jestem współautorem **2** objętych ochroną wzorów przemysłowych.

Tabela 1. Analiza bibliometryczna dorobku naukowego publikacyjnego

Kategoria	PRZED DOKTORATEM			PO DOKTORACIE			OGÓLEM		
	Liczba	IF	MNiSW	Liczba	IF	MNiSW	Liczba	IF	MNiSW
Publikacje oryginalne z listy JCR	4	1,280	63	23	36,845	510	27	38,125	573
Publikacje poglądowe z listy JCR	-	-	-	1	0,236	15	1	0,236	15
Publikacje oryginalne spoza listy JCR	10	-	28	12	-	149	22	-	177
Publikacje poglądowe spoza listy JCR	-	-	-	2	-	7	2	-	7
Rozdziały w monografiach	-	-	-	2	-	8	2	-	8
Publikacje oryginalne w suplementach czasopism	1	-	-	-	-	-	1	-	-
Publikacje branżowe i popularno-naukowe	-	-	-	3	-	-	3	-	-
Łącznie	15	1,280	91	43	37,081	689	58	38,361	780

Tabela 2. Analiza dorobku naukowego pozapublikacyjnego

Kategoria	PRZED DOKTORATEM	PO DOKTORACIE	OGÓLEM
Wystąpienia ustne na konferencjach międzynarodowych	3	1	4
Wystąpienia ustne na konferencjach krajowych	2	11	13
Plakaty przedstawione na konferencjach międzynarodowych	1	3	4
Plakaty przedstawione na konferencjach krajowych	1	13	14
Wzory przemysłowe	1	1	2
Łącznie	8	29	37

6.1. Wskaźniki bibliometryczne dorobku

- Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) **publikacji naukowych**, według listy Journal Citation Reports (JCR) zgodnie z rokiem opublikowania: **38,361**
- Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) **publikacji naukowych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego**, według listy Journal Citation Reports (JCR) zgodnie z rokiem opublikowania: **13,177** (5 prac)
- Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) **publikacji naukowych nie wchodzących w skład osiągnięcia naukowego**, według listy Journal Citation Reports (JCR) zgodnie z rokiem opublikowania: **25,184** (23 prac)
- Liczba punktów za **publikacje naukowe**, według Komunikatów Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego zgodnie z rokiem opublikowania artykułu: **780**
- Liczba punktów za **publikacje naukowe wchodzące w skład osiągnięcia naukowego**, według Komunikatów Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego zgodnie z rokiem opublikowania artykułu: **165**
- Liczba punktów za **publikacje naukowe nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego**, według Komunikatów Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego zgodnie z rokiem opublikowania artykułu: **615**

- Liczba cytowań prac według bazy Web of Science (WoS): **48** (bez autocytowań: 42) (stan na dzień 09.07.2018)
- Liczba cytowań prac według bazy Scopus: **53** (bez autocytowań: 45) (stan na dzień 09.07.2018)
- Indeks Hirscha publikacji według bazy Web of Science (WoS): **4** (stan na dzień 09.07.2018)
- Indeks Hirscha publikacji według bazy Scopus (WoS): **4** (stan na dzień 09.07.2018)
- Przyrost parametrów bibliometrycznych po uzyskaniu stopnia doktora:
 - IF – **37,081**
 - MNiSW – **689**

6.2. Pozapublikacyjne elementy dorobku naukowego

6.2.1. Granty i projekty

W trakcie mojej dotychczasowej pracy naukowej byłem zatrudniony w Politechnice Wrocławskiej na stanowisku adiunkta naukowego (umowa nr R/DZZL/SKD/1110/46229/1) podczas realizacji **Projektu Kluczowego nr POIG.01.01.02-00-016/08** – „Modelowe kompleksy agroenergetyczne jako przykład kogeneracji rozproszonej opartej na lokalnych i odnawialnych źródłach energii” – Zadanie 2.6. Uzdatnianie, składowanie i konfekcjonowanie odpadów pofermentacyjnych.

Byłem **kierownikiem grantu Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, dla Młodych Naukowców MN-1/WF/2016** na finansowanie zadania badawczego: „Ocena tworzenia jedno- i dwugatunkowych biofilmów na cewnikach dokomorowych przez szczepy *Staphylococcus* spp., *Listeria monocytogenes* i *Escherichia coli* z antygenem K1”.

6.2.2. Staże naukowe

Odbyłem trzy staże krajowe:

1. Katedra Mikrobiologii, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, Kraków, 01-13.06.2010 r. - „Zapoznanie z metodami

- stosowanymi w celu oceny produkcji przez drobnoustroje glebowe substancji biologicznie czynnych, w szczególności mykotoksyn oraz antybiotyków”
2. Zakład Genetyki Drobnoustrojów, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź, 06-08.05.2013 r. - "Identyfikacja i genotypowanie klinicznych i środowiskowych szczepów dermatofitów w oparciu o techniki biologii molekularnej"
 3. Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wrocław, 03-31.07.2017 r. - „Ocena inwazyjność szczepów *Listeria monocytogenes* w stosunku do komórek eukariotycznych linii HT-29 oraz ekspresji genów wirulencji związanych z inwazyjnością”

6.2.3. Kursy, szkolenia, seminaria szkoleniowe, warsztaty

Kursy:

1. "Podstawowe metody badań biologii molekularnej" "MBS" Serwis dla Biologii Molekularnej, Warszawa, 10-12.02.2011 r.

Szkolenia:

1. „Zastosowanie statystyki w analizie wyników badań medycznych” StatSoft Polska Sp. z o.o., Bydgoszcz, 15-16.02.2013 r.
2. „Planowanie procedur i doświadczeń na zwierzętach oraz ich przeprowadzanie, a także uśmiercanie zwierząt wykorzystywanych w procedurach”, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Bydgoszcz, 06, 09, 10, 20, 25, 27.11.2015 r.

Seminaria szkoleniowe i warsztaty:

1. Seminarium szkoleniowe „Zapewnienie jakości wyników badań mikrobiologicznych”, MERCK, Warszawa 27.10.2009 r.
2. Seminarium szkoleniowe „Zapewnienie i kontrola jakości pożywek i wyposażenia w laboratorium mikrobiologicznym”, MERCK, Warszawa 22.06.2010 r.
3. Warsztaty „Nowoczesna mikroskopia optyczna z analizą cyfrową obrazu”, OLYMPUS, Bydgoszcz 16.04.2012 r.
4. Warsztaty „Droplet Digital PCR – PCR trzeciej generacji”, BIO-RAD, Bydgoszcz 14.06.2016 r.

-
5. Symposium połączone z warsztatami praktycznymi "Mikroskopia konfokalna - zastosowanie skanera rezonansowego w szybkich badaniach przyżyciowych", OLYMPUS, Gdańsk 16.05.2017 r.
 6. Szkolenie aplikacyjne z obsługi Cobas z480 User Defined Workflow, Roche, Bydgoszcz 08.08.2017 r.

6.2.4. Nagrody i wyróżnienia

W okresie zatrudnienia w Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu byłem laureatem trzech nagród i jednego wyróżnienia:

1. Wyróżnienie Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia w pracy zawodowej w 2012 r.
2. Wyróżnienie indywidualne Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowo-badawczej w 2013 r.
3. Nagroda Naukowa III stopnia im. Prof. Edmunda Mikulaszka przyznana przez Polskie Towarzystwo Mikrobiologów w 2014 r.
4. Wyróżnienie dla nauczycieli akademickich, którzy w procesie oceny zajęć dydaktycznych (prowadzonych w roku akademickim 2015/2016) otrzymali od studentów Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu średnią ocen od 4,95 do 5,00.

6.2.5. Recenzje manuskryptów naukowych

Dotychczas pełniłem funkcję recenzenta 34 manuskryptów naukowych, w tym 19 przesłanych do czasopism uwzględnionych na liście JCR (tabela 3).

Tabela 3. Zestawienie recenzowanych manuskryptów wraz z wykazem czasopism

Czasopismo	Liczba recenzowanych manuskryptów w roku					
	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Czasopisma uwzględnione na liście JCR						
Acta Biochimica Polonica	2		1			
Annals of Agricultural and Environmental Medicine					1*	1*
Bioresource Technology						1*
Ecological Engineering			1			
Ecotoxicology and Environmental Safety					1	
Environmental Engineering and Management Journal				1		
Folia Microbiologica						1
Journal of Applied Microbiology						1*
Journal of Environmental Management						1
Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology		1				
Letters in Applied Microbiology					1*	
Microbial Drug Resistance			1			1*
Natural Product Research						1*
Przemysł Chemiczny	1					
Trends in Food Science and Technology			1			
ŁĄCZNIE	19					
Czasopisma spoza listy JCR						
African Journal of Microbiology Research			2	2		
American Journal of Biomedical and Life Sciences		1				
British Journal of Applied Science and Technology		3*				
British Microbiology Research Journal		5*				
International Journal of Tropical Disease & Health		2*				
ŁĄCZNIE	15					

* - dla manuskryptów oznaczonych gwiazdką posiadam certyfikaty potwierdzające pełnienie funkcji recenzenta

6.2.6. Współpraca naukowo-badawcza z jednostkami naukowymi i przemysłem

Nawiązałem współpracę badawczą z jednostkami naukowymi, zarówno w obrębie macierzystej uczelni, jak i z regionu oraz Polski.

Współpraca z jednostkami Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu:

1. Katedra Higieny, Epidemiologii i Ergonomii, Wydział Nauk o Zdrowiu – realizacja projektów badawczych dotyczących much jako wektora wybranych szpitalnych patogenów alarmowych oraz drobnoustrojów rozprzestrzeniających się za pośrednictwem żywności,
2. Katedra i Zakład Farmakognozji, Wydział Farmaceutyczny – realizacja badań dotyczących składu chemicznego propolisu, jako substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym,
3. Katedra i Zakład Technologii Środków Leczniczych, Wydział Farmaceutyczny – publikacja IIA.12.

Współpraca z innymi jednostkami z Bydgoszczy:

1. Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Bydgoszczy – publikacje P2, P4, P5 i IID.25,
2. Katedra Mikrobiologii i Technologii Żywności, Wydział Rolnictwa i Biotechnologii, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy – publikacje P1, P4, P5, IIA.1, IIA.2, IIA.3, IIA.5, IIA.6, IIA.7, IIA.8, IIA.10, IIA.11, IIA.13, IIA.14, IIA.19, IID.3, IID.11, IID.15, IID.16, IID.17, IID.21 i IID.23,
3. Szpitalny Zakład Diagnostyki Mikrobiologicznej Szpitala Uniwersyteckiego nr 2 im. dr. Jana Bizuela w Bydgoszczy – pozyskiwanie szczepów *L. monocytogenes* od kobiet ciężarnych i noworodków,
4. Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Bydgoszczy – pozyskiwanie szczepów *L. monocytogenes* pochodzących z żywności,
5. Zakład Analityki Żywności i Ochrony Środowiska, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy – ocena składu chemicznego „aktywnego powietrza” generowanego przez technologię RCI,
6. Zakład Fizyki, Instytut Matematyki i Fizyki, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy – badania dotyczące zastosowania mikroskopii sił atomowych w ocenie biofilmów *L. monocytogenes* na różnych powierzchniach.

Współpraca z jednostkami spoza regionu:

1. Centrum Badań i Technologii Radiacyjnych, Instytut Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie – publikacje P4, IIA.7 i IIA.11,
2. Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu – publikacja P1, badania dotyczące oceny inwazyjności szczepów *L. monocytogenes* w stosunku do komórek eukariotycznych linii HT-29 oraz ekspresji genów wirulencji związanych z inwazyjnością,
3. Katedra Zaawansowanych Materiałów i Technologii, Wydział Nowych Technologii i Chemii, Wojskowa Akademia Techniczna w Warszawie - badania w ramach realizacji projektu badawczego PBS3/A5/50/2015 dotyczące oceny efektywności pracy urządzenia termokatalitycznego w aspekcie oczyszczania powietrza z biologicznych substancji toksycznych.

W ramach idei współpracy nauki z obszarem gospodarczym nawiązałem współpracę z następującymi przedsiębiorstwami:

1. ActivTek Sp. z o.o.,
2. Poldanor S.A.,
3. Sano,
4. Tribo Sp. z o.o.

Owocem tej współpracy są trzy publikacje naukowe. Jestem także współautorem trzech ekspertyz i 9 raportów badawczych.

6.3. Osiągnięcia dydaktyczne

Od czasu zatrudnienia na etacie asystenta w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (tj. od 2013 r.) prowadzę zajęcia dydaktyczne dla różnych kierunków studiów wszystkich wydziałów Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (tabela 4).

Tabela 4. Wykaz realizowanych zajęć dydaktycznych

Wydział	Kierunek studiów	Tryb studiów	Forma zajęć	Przedmiot
Wydział Farmaceutyczny	Kosmetologia	Stacjonarne	Laboratoria	Mikrobiologia
Wydział lekarski	Biotechnologia	Stacjonarne	Laboratoria	Mikrobiologia ogólna z elementami wirusologii
		Stacjonarne	Laboratoria	Mikrobiologia przemysłowa
	Optyka okularowa z elementami optometrii	Stacjonarne	Laboratoria	Podstawy mikrobiologii
Wydział Nauk o Zdrowiu	Dietetyka	Stacjonarne	Wykłady	Mikrobiologia ogólna i żywności
			Laboratoria	
		Niestacjonarne	Wykłady	
			Laboratoria	
	Pielęgniarstwo	Stacjonarne	Laboratoria	Mikrobiologia i parazytologia: Mikrobiologia
	Położnictwo	Stacjonarne	Laboratoria	Mikrobiologia z podstawami parazytologii: Mikrobiologia
		Niestacjonarne		
	Ratownictwo medyczne	Stacjonarne	Niestacjonarne	Wykłady
Laboratoria				
Niestacjonarne		Wykłady		
		Laboratoria		

Od czasu uzyskania stopnia naukowego doktora nauk rolniczych, tj. od 2011 r., pełniłem funkcję promotora 14 prac magisterskich, spośród których dwie prace realizowane przez studentów kierunku analityka medyczna otrzymały nagrodę Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych za najlepszą pracę magisterską. Aktualnie pod moją opieką realizowane są trzy kolejne prace magisterskie (dwie przez studentów kierunku analityka medyczna i jedna - kierunku biotechnologia). Ponadto, byłem promotorem jednej pracy inżynierskiej zrealizowanej na Wydziale Rolnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy oraz czterech prac licencjackich powstałych w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. W okresie tym byłem także recenzentem czterech prac magisterskich na tej uczelni. Szczegółowe dane dotyczące pełnienia funkcji promotora przedstawia tabela 5.

Tabela 5. Promotorstwo prac dyplomowych

Uczelnia	Wydział	Kierunek studiów	Liczba prac realizowanych w roku akademickim					
			2012-2013	2013-2014	2014/2015	2015-2016	2016-2017	2017-2018
PRACE MAGISTERSKIE								
Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu	Wydział Farmaceutyczny	Analityka medyczna				1	2	2
		Kosmetologia			1		2	
	Wydział Lekarski	Biotechnologia			1	1	2	1
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. J.J. Śniadeckich w Bydgoszczy	Wydział Rolnictwa i Biotechnologii	Biotechnologia	1					
ŁĄCZNIE			14					
PRACE INŻYNIERSKIE								
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. J.J. Śniadeckich w Bydgoszczy	Wydział Rolnictwa i Biotechnologii	Biotechnologia	1					
ŁĄCZNIE			1					
PRACE LICENCJACKIE								
Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu	Wydział Lekarski	Biotechnologia		1	1	1	1	
ŁĄCZNIE			4					

Aktualnie pełnię funkcję promotora pomocniczego w dwóch wszczętych przewodach doktorskich na Wydziale Rolnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy.

Poza pełnieniem funkcji promotora sprawuję także opiekę na studentami należącymi do Studenckiego Koła Naukowego przy Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Efektem pracy moich podopiecznych jest ich współautorstwo w publikacjach naukowych oraz wystąpienia na konferencjach.

Oprócz zajęć dydaktycznych ze studentami prowadziłem także wykłady i ćwiczenia w ramach kursu „Mikrobiologiczne bezpieczeństwo żywności, wody i powietrza. Zagrożenia biologiczne” realizowanego dla diagnostów laboratoryjnych specjalizujących się w mikrobiologii medycznej.

Uczestniczyłem w pracach zespołu przygotowującego sylabusy dla kierunków analityka medyczna i kosmetologia.

6.4. Dorobek organizacyjny

W trakcie dotychczasowej pracy zawodowej brałem udział w organizacji konferencji naukowych o różnym zasięgu, pełniąc funkcję:

- członka komitetu programowego konferencji międzynarodowej
 1. The International Conference on Medical Science and Human Health, 19-21.05.2017 r. Suzhou, Chiny
- członka komitetu naukowego konferencji ogólnopolskich
 1. I Ogólnopolska Konferencja „Drobnoustroje w świecie człowieka – Drobnoustroje oportunistyczne” Bydgoszcz 18-20.09.2014 r.
 2. Ogólnopolska Konferencja „Działania przeciwdrobnoustrojowe. Drobnoustroje – wpływ czynników fizycznych i chemicznych”, Bydgoszcz 24.06.2015 r.
- przewodniczącego komitetu organizacyjnego konferencji ogólnopolskiej
 1. Ogólnopolska Konferencja „Działania przeciwdrobnoustrojowe. Drobnoustroje – wpływ czynników fizycznych i chemicznych”, Bydgoszcz 24.06.2015 r.
- wiceprzewodniczącego komitetu organizacyjnego konferencji ogólnopolskiej
 1. XXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów „Mikrobiologia – nowe wyzwania, nowe możliwości”, Bydgoszcz 25-27.09.2016 r.
- sekretarza komitetu organizacyjnego konferencji ogólnopolskich

1. I Ogólnopolska Konferencja „Drobnoustroje w świecie człowieka – Drobnoustroje oportunistyczne”, Bydgoszcz 18-20.09.2014 r.
2. II Ogólnopolska Konferencja „Drobnoustroje w świecie człowieka – Drobnoustroje oportunistyczne”, Bydgoszcz 20-21.05.2016 r.
3. III Ogólnopolska Konferencja „Drobnoustroje w świecie człowieka – Drobnoustroje oportunistyczne”, Bydgoszcz 18-19.06.2018 r.

Od 2010 r. jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, a w kadencjach 2012-2016 oraz 2016-2020 pełnię funkcję sekretarza Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów Oddział w Bydgoszczy. W kadencji 2012-2016 pełniłem funkcję webmastera strony Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów oraz stron czasopism wydawanych przez Towarzystwo – Polish Journal of Microbiology i Postępów Mikrobiologii.

Jestem członkiem zwyczajnym Stowarzyszenia „Rozwój Mikrobiologii” (od 2011 r.) oraz Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Rolnictwa (od 2010 r.).

Otrzymałem nominację na członka grupy eksperckiej uczestniczącej w roboczym spotkaniu na temat: "Radiation Technologies for Waste Water & Sludge Treatment: Emerging Needs, Challenges and Business Opportunities", które odbyło się w dniach 04-08.03.2013 r. w Wiedniu.

W ramach Katedry i Zakładu Mikrobiologii Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu zorganizowałem Pracownię Działań Przeciwdrobnoustrojowych.

6.5. Dorobek popularyzatorski

Działalność popularyzatorska polegała głównie na prowadzeniu wykładów i warsztatów kierowanych do osób związanych, jak i niezwiązanych, zawodowo z mikrobiologią z różnych grup wiekowych.

- Wykłady kierowane do mikrobiologów różnych specjalności
 1. „Higieniczne aspekty biologicznych i fizycznych metod uzdatniania gnojowicy”, **posiedzenie Komitetu Mikrobiologii Polskiej Akademii Nauk**, Bydgoszcz, 11.06.2010 r.
 2. „Biofilm *Listeria monocytogenes* na produktach spożywczych i powierzchniach związanych z przetwórstwem żywności”, **zebranie naukowo-szkoleniowe PTM Oddział w Bydgoszczy**, Bydgoszcz, 07.03.2014 r.

-
3. „Lekowrażliwość szczepów *Listeria monocytogenes* izolowanych z mleka krowiego”, **zebranie naukowo-szkoleniowe PTM Oddział w Bydgoszczy**, Bydgoszcz, 21.09.2015 r.
- Wykłady dla innych grup zawodowych
 1. “Mikrobiologia, zdrowie i higiena zwierząt laboratoryjnych. Zasady bezpieczeństwa pracy ze zwierzętami”, kurs dla osób pracujących ze zwierzętami laboratoryjnymi, Bydgoszcz, 25.11.2015 r.
 2. „Skuteczność zabiegów dezynfekcyjnych wobec pałeczek *Listeria monocytogenes*” dla pracowników firmy SaneChem Sp. z o.o., Warszawa.
 - Wykłady popularno-naukowe dla różnych grup wiekowych
 1. „Wrogowie z lodówki, czyli mikroflora Twojej kuchni” w ramach cyklu ogólnodostępnych wykładów popularno-naukowych „**Medyczna Środa**”, Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Bydgoszcz, 10.12.2014 r.
 2. „Pogawędki drobnoustrojów, czyli quorum sensing w biofilmach” w ramach cyklu ogólnodostępnych wykładów popularno-naukowych „**Medyczna Środa**”, Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Bydgoszcz, 01.06.2016 r.
 - Warsztaty dla różnych grup wiekowych, w tym dzieci i młodzieży
 1. „Powietrze – taksówka dla drobnoustrojów” w ramach Dnia Nauki „**Medicalia**” w Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Katedra i Zakład Mikrobiologii, Bydgoszcz, 16.11.2013 r. i 15.11.2014 r.
 2. "Wrogowie z lodówki, czyli mikroflora Twojej kuchni” w ramach Dnia Nauki „**Medicalia**” w Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Katedra i Zakład Mikrobiologii, Bydgoszcz, 28.11.2015 r.
 3. „Powietrze – taksówka dla drobnoustrojów” w ramach **Bydgoskiego Festiwalu Nauki**, Bydgoszcz, 23.05.2015 r.
 4. "Zbuduj swoją bakterię” w ramach **Bydgoskiego Festiwalu Nauki**, Bydgoszcz, 25.05.2017 r.

5. "Ocena czystości mikrobiologicznej i skuteczności mikrobiobójczej wybranych przypraw ziołowych" w ramach **Bydgoskiego Festiwalu Nauki**, Bydgoszcz, 23.05.2018 r.

7 Piśmiennictwo

1. Ayebah B, Hung Y, Frank JF. 2005. Enhancing the bactericidal effect of electrolyzed water on *Listeria monocytogenes* biofilms formed on stainless steel. J Food Prot. 68(7): 1375-1380.
2. Bagge-Ravn D, Ng Y, Hjelm M, Christiansen JN, Johansen C, Gram L. 2003. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries-analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. Int J Food Microbiol. 87(3): 239-50.
3. Bohdziewicz J, Kuglarz M. 2009. Produkty uboczne produkcji zwierzęcej jako źródło energii odnawialnej. Proceedings of ECOpole. 3(2): 421-425.
4. Capita R, Alonso-Calleja C. 2013. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. Crit Rev Food Sci Nutr. 53(1): 11-48.
5. Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. App Environ Microbiol. 68(6): 2950-2958.
6. Dongyou L. 2008. Handbook of *Listeria monocytogenes*. CRC Press.
7. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. EFSA Journal 2017. 15(12): 5077, 228.
8. Fan X, Sokorai K, Weidauer A, Gotzmann G, Rögner F, Koch E. 2017. Comparison of gamma and electron beam irradiation in reducing populations of *E. coli* artificially inoculated on mung bean, clover and fenugreek seeds, and affecting germination and growth of seeds. Rad Phys Chem. 130: 306–315.
9. Flannigan B, Samson RA, Miller JD. 2011. Microorganisms in home and indoor work environments. Diversity, health impacts, investigation and control. Wyd. Londyn. CRC Press. 539.
10. Fujishima A, Honda K. 1972. Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode, Nature. 238: 37-38.
11. Gambarin, P, Magnabosco C, Losio MN, Pavoni E, Gattuso A, Arcangeli G, Favretti M. 2012. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat seafood and potential hazards for the consumers. Int J Food Microbiol. Article ID 497635, 10 pages.
12. Gandhi M, Chikindas M. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. Int J Food Microbiol. 113(1):1-15.
13. Gómez D, Azón E, Marco N, Carramiñana JJ, Rota C, Ariño A, Yangüela J. 2014. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. Food Microbiol. 42: 61-65.
14. Grinshpun SA, Adhikari A, Honda T, Kim KY, Toivola M, Rao KSR, Reponen T. 2007. Control of aerosol contaminants in indoor air: combining the particle concentration reduction with microbial inactivation, Environ. Sci Technol. 41: 606-612.

15. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2(2): 95-108.
16. Health Department of Republic of South Africa. 2018. Listeriosis outbreak situation report - 27/04/2018. WHO Country Emergency Preparedness and Readiness Technical Meeting Listeriosis Outbreak in collaboration with MoH and Partners. Johannesburg 19-21 April 2018.
17. Ihsanullah I, Rashid A. 2017. Current activities in food irradiation as a sanitary and phytosanitary treatment in the Asia and the Pacific Region and a comparison with advanced countries. *Food Control.* 72: 345-359.
18. Ismaïl R, Aviat F, Michel V, Bayon I, Gay-Perret P, Kutnik M, Fédérighi M. 2013. Methods for recovering microorganisms from solid surfaces used in the food industry: a review of the literature. *Int J Environ Res Public Health.* 10: 6169-6183.
19. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, Hussain T, Ali M, Rafiq M, Kamil MA. 2018. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc.* 81(1): 7-11.
20. Jamali H, Thong KL. 2014. Genotypic characterization and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat foods. *Food Control.* 44: 1-6.
21. Jami M, Ghanbari M, Zunabovic M, Doming KJ, Kneifel W. 2014. *Listeria monocytogenes* in aquatic food products - a review. *Compr Rev Food Sci F.* 13: 798-813.
22. Jeyaletchumi P, Tunung R, Margaret SP, Son R, Farinazleen MG. 2010. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *Int Food Res J.* 17: 1-11.
23. Jung Ch, Wu P, Tseng Ch, Su H. 2015. Indoor air quality varies with ventilation types and working areas in hospitals. *Build Environ.* 85: 190e195.
24. Khan S, Beattie TK, Knapp CW. 2016. Relationship between antibiotic- and disinfectant-resistance profiles in bacteria harvested from tap water. *Chemosphere.* 152: 132-141.
25. Kołacz R, Dobrzański Z. 2006. Higiena i dobrostan zwierząt gospodarskich. Wyd. 1. Wrocław. Wydaw. Akademii Rolniczej we Wrocławiu. 537.
26. Kołwzan B. 2011. Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstawania i funkcjonowania. *Ochr. Środ.* 33, 4: 1-14.
27. Kristiansen A, Saunders AM, Hansen AA, Nielsen PH, Nielsen JL. 2012. Community structure of bacteria and fungi in aerosols of a pig confinement building. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiol Ecology.* 80: 390-401.
28. Królasik J, Szosland-Fałtyń A. 2015. Dynamika tworzenia biofilmu *Listeria monocytogenes* na powierzchni polipropylenu w obecności drobnoustrojów natywnych środowiska produkcji żywności. *Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego.* 70(2): 53-65.
29. Lacroix M. 2014. Irradiation in: Emerging technologies for food processing. Editor: Da-Wen Sun, Published by Elsevier Academic Press. Amsterdam. The Netherlands. 293-312.
30. Ledakowicz S, Krzystek L. 2005. Wykorzystanie fermentacji metanowej w utylizacji odpadów przemysłu rolno-spożywczego. *Biotechnologia.* 3(70): 165-183.
31. Lima T, Chob J, Kim BS. 2010. The predictions of infection risk of indoor airborne transmission of diseases in high-rise hospitals: Tracer gas simulation. *Energ Buildings.* 42: 1172-1181.
32. Lung HM, Cheng YC, Chang YH, Huang HW, Yang BB, and Wang CY. 2015. Microbial decontamination of food by electron beam irradiation. *Trends Food Sci Technol.* 44: 66-78.

-
33. Maciejewska M, Bauer M, Dawgul M. 2016. Nowoczesne metody zwalczania biofilmu bakteryjnego. *Post Mikrobiol.* 55(1): 3-11.
 34. Małecka I, Borowski G. 2011. Dezynfekcja powietrza promieniami UV i promieniową jonizacją katalityczną w instalacjach wentylacyjnych, *Zeszyty Naukowe – Inżyniera Lądowa i Wodna w Kształtowaniu Środowiska.* 3: 25-30.
 35. Minor T, Lasher A, Klontz K, Brown B, Nardinelli C, Zorn D. 2015. The per case and total annual costs of foodborne illness in the United States. *Risk Analysis.* 35(6): 1125-1139.
 36. Moga M, Małecka I. 2011. Wpływ zjonizowanego powietrza na organizm ludzki, *Zeszyty Naukowe – Inżyniera Lądowa i Wodna w Kształtowaniu Środowiska.* 4: 26-29.
 37. Niemira BA, Fan X, Sokorai KJB. 2005. Irradiation and modified atmosphere packaging of oxidative influences survival and regrowth of *Listeria monocytogenes* and product sensory qualities. *Radiat Phys Chem.* 72: 41-48.
 38. Olszewska H, Paluszak Z, Szejniuk B. 1997. Badania przeżywalności drobnoustrojów *Salmonella* Enteritidis w gnojowicy, ścieku bytowym i wodzie w warunkach laboratoryjnych., *Materiały na sympozjum: Problemy higieny w ekologizacji rolnictwa.* SGGW Warszawa. 208-213.
 39. Ortega MT, Franken LJ, Hatesohl PR, Marsden JL. 2007. Efficacy of ecoquest radiant catalytic ionization cell and breeze at ozone generator at reducing microbial populations of stainless steel surfaces. *J Rapid Meth Aut Mic.* 15: 359-368.
 40. Paluszak Z. 1998. Badania nad zachowaniem i przeżywalnością wybranych drobnoustrojów fekalnych w glebie nawożonej gnojowicą. *Rozprawy nr 85.* Wydawnictwo Uczelniane ATR Bydgoszcz.
 41. Poimenidou SV, Chrysadaku M, Tzakoniati A, Bikouli VC, Nychas GJ, Skandamis PN. 2016. Variability of *Listeria monocytogenes* strains in biofilm formation on stainless steel and polystyrene materials and resistance to peracetic acid and quaternary ammonium compounds. *Int J Food Microbiol.* 237: 164-171.
 42. Popescu S, Borda C, Diugan EA, Oros D. 2014. Microbial air contamination in indoor and outdoor environment of pig farms. *Anim Sci Biotech.* 47(1): 182–187.
 43. Roberts PB. 2014. Food irradiation is safe: Half a century of studies. *Radiat Phys Chem.* 105: 78–82.
 44. Salustiano VC, Andrade NJ, Brandão SC. 2003. Microbiological air quality of processing areas in a dairy plant as evaluated by the sedimentation technique and a one-stage air sampler. *Braz J Microbiol.* 34: 255–259.
 45. Schlegelová J, Babák V, Holasová M, Konstantinová L, Necidová L, Šišák F, Vlková H, Roubal P, Jaglic Z. 2010. Microbial contamination after sanitation of food contact surfaces in dairy and meat processing plants. *Czech J Food Sci.* 28(5): 450–461.
 46. Shale K, Lues JFR. 2007. The etiology of bioaerosols in food environments. *Food Rev Internat.* 23: 73-90.
 47. Shi W, Qingping W, Jumei Z, Moutong C, Zéan Y. 2015. Prevalence, antibiotic resistance and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from retail ready-to-eat foods in China. *Food Control.* 47: 340-347.
 48. Shiomori, T, Miyamoto, H, Makishima, K, Yoshida, M, Fujiyoshi, T, Udaka, T, Inaba, T, Hiraki, N. 2002. Evaluation of bedmaking-related airborne and surface methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* contamination. *J Hosp Infect.* 50: 30-35.

49. Sommers C, Sheen S, Scullen OJ, Mackay W. 2017. Inactivation of *Staphylococcus saprophyticus* in chicken meat and purge using thermal processing, high pressure processing, gamma radiation, and ultraviolet light (254 nm). *Food Control*. 75: 78-82.
50. Space Foundation, Radiant Catalytic Ionization Air & Water Purification, <http://www.spacefoundation.org/programs/space-certification/certified-products/space-technology/radiant-catalytic-ionization-air>, data wejścia: 04.06.2018.
51. Strauch D. 1991. Survival of pathogenic micro-organisms and parasites in excreta, manure and sewage sludge. *Rev Sci. Sech. Off Int Epiz.* 10(3): 813-846.
52. Syne SM, Ramsuhag A, Adesiyun A. 2013. Microbiological hazard analysis of ready-to-eat meats processed at a food plant in Trinidad, West Indies. *Infect Ecol Epidemiol.* 3: 1-12.
53. Tang KL, Caffrey NP, Nóbrega DB, Cork SC, Ronksley PE, Barkema HW, Polachek AJ, Ganshorn H, Sharma N, Kellner JD, Ghali WA. 2017. Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Planetary Health.* 1(8): 316–327.
54. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017. <http://www.eucast.org>
55. Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev.* 14(3): 584-640.
56. Venglovsky J, Sasakova N, Placha I. 2009. Pathogens and antibiotic residues in animal manures and hygienic and ecological risks related to subsequent land application. *Bioresource Technol.* 100: 5386-5391.
57. Watabe M, Rao JR, Stewart TA, Xu J, Millar BC, Xiao L, Lowery CJ, Dooley JSG, Moore JE. 2003. Prevalence of bacterial faecal pathogens in separated and unseparated stored pig slurry. *Lett Appl Microbiol.* 36: 208-212.
58. WHO. 2017. Food safety. WHO Fact Sheet.
59. WHO. 2018. Listeriosis – Australia. Disease outbreak news.
60. Winczewski M, Malicki M. 2011. Syndrom chorego budynku a technologia ActivTek. *Facility Manager.* 5 (52) 24-25.
61. Zhao J, Yang X. 2003. Photocatalytic oxidation for indoor air purification: a literature review. *Build Environ.* 38: 645-654.

Krzysztof Skowron

.....