

AUTOREFERAT

DR INŻ. JUSTYNA BAUZA-KASZEWSKA

Katedra Mikrobiologii i Technologii Żywności
Wydział Rolnictwa i Biotechnologii
Uniwersytet Technologiczno - Przyrodniczy
w Bydgoszczy
Ul. Bernardyńska 6
85-029 Bydgoszcz

Bydgoszcz 2015

Autoreferat – spis treści

I.	Część wstępna.....	1
II.	Charakterystyka osiągnięcia naukowego.....	2
	2.1. Cel i zakres badań.....	3
	2.2. Wyniki i wnioski.....	4
	2.2.1. Kompostowanie jako metoda przetwarzania produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do wykorzystania rolniczego ograniczająca ryzyko skażenia środowiska	4
	2.2.2. Wapnowanie jako metoda przetwarzania produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do wykorzystania rolniczego ograniczająca ryzyko skażenia środowiska.....	6
	2.2.3. Zakwaszanie jako metoda przetwarzania produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do wykorzystania rolniczego ograniczająca ryzyko skażenia środowiska.....	8
	2.2.4. Oddziaływanie promieniowania mikrofalowego jako metoda przetwarzania produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do wykorzystania rolniczego ograniczająca ryzyko skażenia środowiska.....	10
	2.3. Podsumowanie.....	11
	2.4. Najważniejsze osiągnięcia wynikające z uzyskanych wyników.....	12
III.	Charakterystyka pozostałej aktywności naukowej.....	12
	3.1. Omówienie zainteresowań naukowo-badawczych i pozostałych osiągnięć.....	12
	3.2. Zestawienie danych naukometrycznych dotyczących dorobku naukowego.....	21
	3.3. Nagrody.....	22

Dr inż. Justyna Bauza-Kaszewska
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy
Wydział Rolnictwa i Biotechnologii
Katedra Mikrobiologii i Technologii Żywności

Bydgoszcz, 15.12.2015

Autoreferat

I. Część wstępna

Urodziłam się 30 stycznia 1972 r. w Szubinie. Edukację na poziomie podstawowym i średnim ukończyłam w 1991 roku. W latach 1991-1996 kontynuowałam edukację na poziomie akademickim na Wydziale Rolnictwa i Biotechnologii (ówczesny Wydział Rolniczy) Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy (ówczesna Akademia Techniczno-Rolnicza) na kierunku rolnictwo w systemie stacjonarnym, jednolitym magisterskim. W lipcu 1996 roku uzyskałam tytuł zawodowy magistra inżyniera rolnictwa w specjalności: ochrona roślin. Pracę magisterską p.t.: Wpływ różnych systemów zmianowania na zdrowotność grochu pastewnego odmiany „Fidelia”, przygotowałam w Katedrze Fitopatologii (obecnie Katedra Entomologii i Fitopatologii Molekularnej) pod promotorstwem prof. dr hab. Stanisława Sadowskiego, ówczesnego kierownika tej jednostki (obecnie korzysta z praw emerytalnych). W grudniu 1996 roku zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Katedrze Mikrobiologii (obecnie Katedra Mikrobiologii i Technologii Żywności), w której przygotowałam rozprawę doktorską p.t.: Mikrobiologiczne badania kompostowanych osadów pościekowych przeznaczonych do użytku rolniczego. Obowiązki promotora pełnił prof. dr hab. Zbigniew Paluszak, kierownik Katedry, a recenzentów – prof. dr hab. Wiesław Barabasz z Katedry Mikrobiologii Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie oraz prof. dr hab. Janusz Hermann z Katedry Chemii Środowiska Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy. 25 czerwca 2004 roku uzyskałam stopień doktora nauk rolniczych w dyscyplinie agronomii i w listopadzie 2005 roku zostałam mianowana na stanowisko adiunkta w Katedrze Mikrobiologii i Technologii Żywności, w której obecnie pracuję.

II. Charakterystyka osiągnięcia naukowego.

Przedstawiam osiągnięcie naukowe p.t.

Ocena efektywności wybranych metod higienizacji produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego (PUPZ) i produktów pochodnych przeznaczonych do wykorzystania rolniczego jako element strategii ograniczania transmisji patogenów do środowiska.

Osiągnięcie dokumentuje sześć następujących jednotematycznych publikacji naukowych:

1. Paluszak Z., **Bauza-Kaszewska J.**, Skowron K. 2011: Effect of animal by-products composting process on the inactivation of indicator bacteria. B Vet I Pulawy, 55: 45-49. **20p. IF 0,414**
2. Paluszak Z., **Bauza-Kaszewska J.** 2011: Inactivation of indicator bacteria in animal by product sanitised by CaO. B Vet I Pulawy, 55: 699-703. **20p. IF 0,414**
3. **Bauza-Kaszewska J.**, Paluszak Z. 2012: Wpływ zróżnicowanych dawek wysokoreaktywnego tlenku wapna na przeżywalność pałeczek *Salmonella* w odpadach mięsnych. Przem Chem, 91 (5): 680-683. **15p. IF 0,344**
4. **Bauza-Kaszewska J.**, Paluszak Z. Skowron K., 2014: Viability of *Clostridium sporogenes* spores after CaO hygienization of meat waste. Ann Agr Env Med, 21(3): 485-488. **10p. IF 1,126**
5. **Bauza-Kaszewska J.**, Paluszak Z., Keutgen A.J., 2014: Effect of formic acid and heat treatment on *Clostridium sporogenes* spores inactivation in animal by-products. Med Weter, 70(11): 684-688. **15p. IF 0,218**
6. **Bauza-Kaszewska J.**, Skowron K., Paluszak Z., Dobrzański Z., Śrutek M., 2014: Effect of microwave radiation on microorganisms in fish meals. Ann Anim Sci, 14 (3): 623-636. **20p. IF 0,613**

Wartość naukometryczna publikacji dokumentujących osiągnięcie naukowe wynosi 100 pkt, wg aktualnej kategoryzacji czasopism MNiSW oraz IF na poziomie 3,129.

W załączonym dokumencie nr 4 przedkładałam oświadczenia współautorów określające ich indywidualny wkład w powstanie publikacji.

2.1. Cel i zakres badań.

Celem przeprowadzonych badań była analiza i ocena efektywności wybranych metod higienizacji różnych typów produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego (PUPZ) i produktów pochodnych przeznaczonych do wykorzystania rolniczego. Ze względu na znaczną zawartość związków organicznych – doskonałego podłoża dla rozwoju mikroorganizmów, materiały te stanowią dla środowiska naturalnego istotne źródło zagrożeń o charakterze epidemiologicznym. Świadomość wysokiego stopnia ryzyka, związanego z możliwością transmisji zasiedlających skażoną biomasę patogenów do gleby lub wody, wymogła szybką regulację zasad gospodarowania PUPZ. Zgodnie z Rozporządzeniami 1774/2002 i 1069/2009 Parlamentu Europejskiego i Rady, produkty uboczne pochodzenia zwierzęcego podzielono na 3 kategorie, określając równocześnie dopuszczalne metody ich zagospodarowania. W przypadku większości materiałów sklasyfikowanych w ramach kategorii 1. i 2. poddanie ich radykalnie działającym, termicznym metodom przetwarzania pozwala na automatyczne wyeliminowanie problemu pojawiania się patogenów w produkcie finalnym, a PUPZ kategorii 3. mogą być również przetwarzane przy zastosowaniu innych technologii zapewniających ich skuteczną higienizację. Większość z tych procesów opiera się na letalnym wpływie wysokiej temperatury na komórki drobnoustrojów. Wysoka efektywność tych metod wiąże się, niestety, z koniecznością poniesienia znaczących nakładów finansowych, zarówno w celu ich wdrożenia, a także późniejszego, płynnego funkcjonowania. Dotyczą one głównie wytworzenia i utrzymania wymaganych ustawowo parametrów termicznych procesu, a także transportu PUZP do wyznaczonych, certyfikowanych jednostek przetwórczych, dysponujących aparaturą zapewniającą skuteczny przebieg utylizacji. Podejmowane w związku z tym próby opracowania alternatywnych technik higienizacji produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do wykorzystania rolniczego, których aplikacja doprowadziłaby do obniżenia generowanych kosztów, wydają się w pełni uzasadnione.

Wśród zalecanych przez unijne prawo metod przetwarzania PUPZ trzeciej kategorii znajduje się między innymi kompostowanie (poprzedzone w niektórych przypadkach

działaniem wysokiej temperatury) – stanowiące przedmiot badań jednej z prac dokumentujących osiągnięcie naukowe (publikacja nr 1). Ponadto prawodawstwo EU dopuszcza sytuacje, gdy PUPZ są usuwane lub stosowane zgodnie z zatwierdzonymi metodami alternatywnymi. W pracach nr 2 – 6, wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, podjęto próbę wyznaczenia optymalnych parametrów procesów higienizacji produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego i produktów pochodnych przeznaczonych do wykorzystania rolniczego, w oparciu o działanie CaO, kwasów organicznych i promieniowania mikrofalowego.

Nie poddając dyskusji powszechnie znanych faktów dotyczących inhibicyjnego wpływu wymienionych wcześniej czynników na drobnoustroje, założono jednak, że specyfika PUPZ jako środowiska życia badanych bakterii nie może pozostać bez wpływu na ich wrażliwość w stosunku do tych czynników. Problemem naukowym, który mógł znaleźć rozwiązanie dzięki przeprowadzonym badaniom, było określenie, czy ich efektywność higienizacyjna nie ulegnie drastycznemu obniżeniu w tak szczególnych dla mikroorganizmów warunkach życia.

2.2. Wyniki i wnioski

2.2.1. Kompostowanie jako metoda przetwarzania produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do wykorzystania rolniczego ograniczająca ryzyko skażenia środowiska.

Kompostowanie odpadów organicznych stanowi jedną z najstarszych metod ich zagospodarowania. Oprócz typowych odpadów rolniczych, przetwarzane są w ten sposób również osady ściekowe i odpady komunalne. Obowiązujące parametry procesu kompostowania PUPZ kategorii trzeciej zakładają, że gwarancję biobezpieczeństwa uzyskanego produktu końcowego zapewni, utrzymującą się przez 60 minut, temperatura 70°C. W przypadku wprowadzania nowych rozwiązań, konieczne jest przeprowadzenie walidacji procesu, potwierdzającej, że zapewni on zmniejszenie liczby *Enterococcus faecalis* lub *Salmonella* Senftenberg (775W, H₂S ujemne) o 5 log₁₀ oraz, w przypadku gdy istotne zagrożenie stanowią ciepłooporne wirusy, zmniejszenie miana ich zakaźności o co najmniej 3 log₁₀.

Poddając kompostowaniu produkty uboczne pochodzenia zwierzęcego, należy brać pod uwagę wysoki stopień heterogeniczności tych materiałów, czego następstwem są problemy z wygenerowaniem, a zwłaszcza utrzymaniem, odpowiednio wysokiej temperatury

w całej objętości kompostowanej biomasy. Trudności takie obserwowano również w trakcie badań stanowiących przedmiot publikacji nr 1, wchodzącej w skład prezentowanego osiągnięcia naukowego. Jego celem było określenie wpływu kompostowania w bioreaktorze PUZP z dodatkiem trocin na przeżywalność bakterii z rodzaju *Enterococcus* oraz pałeczek *Escherichia coli* i *Salmonella* Senftenberg 775W. Pomimo tego, że satysfakcjonującą wartość temperatury (68°C), która powinna zagwarantować higienizację kompostowanego materiału, udało się uzyskać tylko w jednym cyklu doświadczalnym, efektem jej działania była całkowita eliminacja z biomasy badanych drobnoustrojów po 30 godzinach procesu. W próbkach analizowanych w kolejnym terminie (po 63 godzinach) również nie wykrywano obecności mikroorganizmów wskaźnikowych, co wskazuje, że mimo spadku temperatury nie dochodziło do wtórnego namnażania się patogenów w przetwarzanym materiale. To niebezpieczne zjawisko, potwierdzone wcześniej między innymi w odniesieniu do pałeczek *Salmonella*, niesie za sobą ryzyko wprowadzenia do gleby materiałów mogących stanowić źródło jej skażenia, nawet, jeśli wcześniej uznane zostały one za mikrobiologicznie bezpieczne.

O kluczowej roli wysokiej temperatury w procesie eliminacji drobnoustrojów z kompostowanej biomasy świadczą wyniki uzyskane w drugim cyklu doświadczalnym. Przy wartościach temperatury nie przekraczających 40°C przeżywalność najbardziej odpornych – enterokoków, sięgała ponad 6 tygodni.

Ponieważ heterogeniczność materiału utrudnia pobór jego reprezentatywnych próbek i rzetelną ocenę ich jakości mikrobiologicznej, do wprowadzenia bakterii do biomasy wykorzystano dwa typy nośników – zabezpieczone metalową siateczką kawałki mięsa różnej wielkości (kostki 3x3cm i 5x5cm) oraz nośniki z pleksiglasu wypełnione mielonym mięsem. Analizując ich przydatność w celu walidacji procesu kompostowania nie zaobserwowano jednak wyraźnej tendencji dowodzącej zróżnicowania tempa inaktywacji mikroorganizmów testowych w zależności od zastosowanego nośnika.

Wnioski: Przeprowadzone badania dowodzą dużego potencjału w zakresie wykorzystania technologii kompostowania do utylizacji produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego. Relatywnie niskie nakłady finansowe, możliwość przetwarzania PUPZ bezpośrednio przy zakładach przetwórstwa mięsnego, bez konieczności transportu do specjalnie do tego celu przystosowanych jednostek, wreszcie ewentualne wykorzystanie produktów końcowych do celów nawozowych to istotne argumenty na rzecz kontynuacji badań nad optymalizacją parametrów tej metody. Równocześnie nie można bagatelizować komplikacji związanych ze specyfiką PUZP jako substratu kompostowania – wysoka

wilgotność oraz zawartość suchej masy, różnice w wielkości i objętości poszczególnych komponentów kompostowanej biomasy, wymuszają szczególną ostrożność przy ostatecznym potwierdzeniu skuteczności higienizacyjnej konkretnej technologii.

2.2.2. Wapnowanie jako metoda przetwarzania produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do wykorzystania rolniczego ograniczająca ryzyko skażenia środowiska.

Wykorzystanie związków wapnia w celu szybkiej i skutecznej utylizacji odpadów praktykowane jest od dawna, a możliwość ich aplikacji doceniano szczególnie w sytuacjach wysokiego zagrożenia epidemiologicznego. Bakteriobójcze działanie najczęściej wykorzystywanego do tego celu tlenku wapna CaO (wapno palone) związane jest przede wszystkim z podwyższeniem temperatury biomasy na drodze gwałtownej reakcji egzotermicznej oraz alkalizacji jej odczynu do wartości $\text{pH} > 12$.

W badaniach nad wpływem CaO na przeżywalność mikroorganizmów w PUPZ wykorzystano, podobnie jak w publikacji nr 1, należące do rodziny *Enterobacteriaceae* pałeczki *E. coli* i *S. Senftenberg* 775W oraz paciorkowce z rodzaju *Enterococcus*, którymi zaszczepiano mięso mielone o zawartości suchej masy ok. 36% (publikacje nr 2, 3). Wszystkie z zastosowanych dawek wapna (10, 20, 25, 30%) powodowały wzrost pH biomasy powyżej 12. Wartość ta uznawana jest za krytyczną dla procesu higienizacji, bowiem jej uzyskanie, w kombinacji z odpowiednią temperaturą, gwarantuje eliminację drobnoustrojów z przetwarzanego materiału. Warunki termiczne, które panowały wewnątrz biomasy, nie spełniały jednak kryteriów umożliwiających uznanie ich za czynniki determinujące skuteczność higienizacji. O ile wielu autorów potwierdza możliwość uzyskania relatywnie wysokiej temperatury (50-55°C) nawet w przypadku wapnowania tak heterogennego materiału jak PUZP, jej wartości uzyskane w badaniach własnych dalekie były od termofilnych, osiągając poziom około 40°C. Mimo tego, inaktywacja pałeczek *E. coli* i *S. Senftenberg* następowała w czasie od kilku do kilkunastu godzin, w zależności od stężenia CaO wymieszanego ze skażonym mięsem. Bez względu na dawkę oraz termin poboru próbek wyższą wrażliwość na wapnowanie wykazywała *E. coli*. Z kolei enterokoki, dzięki wielokrotnie potwierdzonej wysokiej odporności na działanie czynników stresogennych, przy stężeniu 10% CaO przeżywały w wapnowanym materiale ok. 36 godzin. Najszybsze tempo inaktywacji towarzyszyło oczywiście najwyższym dawkom CaO – przy stężeniu 30% *Salmonella* ginęła już po 1 godzinie, po takim samym czasie stężenie 10% prowadziło do redukcji jej liczebności o ok. 3 jednostki logarytmiczne – z $1,10 \times 10^9$ do $1,26 \times 10^6$ NPL·g⁻¹.

Cytowane powyżej wyniki pochodzą z posiewów z próbek, których odczyn po pobraniu poddawano neutralizacji przy pomocy $\text{NaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$. W próbkach pochodzących z tego samego materiału, ale badanych bez uprzedniej neutralizacji pH, wyniki wskazywały na szybszą eliminację bakterii. Różnice w pomiarach sięgały wartości rzędu kilku jednostek logarytmicznych, co wskazuje na konieczność buforowania analizowanych próbek w celu uzyskania wiarygodnych rezultatów.

Istotną część badań nad zastosowaniem CaO do higienizacji PUPZ stanowiły analizy wpływu tego związku chemicznego na przetrwalniki wytwarzane przez beztlenowe laseczki *Clostridium sporogenes* (publikacja nr 4). Zniszczenie charakteryzujących się wysoką termoopornością spor daje absolutną gwarancję, że w przetwarzanym materiale nie przeżyją również te mikroorganizmy, które w swoim cyklu życiowym nie wytwarzają podobnych struktur. Ponadto podnosi to prawdopodobieństwo eliminacji z biomasy form przetrwalnych produkowanych przez inne gatunki, np. chorobotwórcze *C. botulinum* lub *C. perfringens*. *C. sporogenes*, mimo że nie stwarzają bezpośredniego zagrożenia dla zdrowia ludzkiego, ze względu na właściwości zbliżone do wymienionych wcześniej patogenów, wykorzystywane są często w badaniach naukowych jako ich surogaty.

Zakładając, że ilość CaO niezbędna do zniszczenia przetrwalników musi być większa, niż w przypadku mikroorganizmów występujących w formie wegetatywnej, do zaszczepionej sporami biomasy dodano wapno palone w stężeniu 50 i 70%. Dodatkowym czynnikiem, którego wpływ na skuteczność higienizacji poddano analizie, była sucha masa PUZP – oprócz mięsa mielonego o zawartości s.m. ok. 36%, sporami zaszczepiono również mieszaninę mięsa z krwią (zawartość s.m. ok. 25%). Bez względu jednak na wartość tego parametru i niezależnie od dawki wapna, zaobserwowano bardzo szybki proces alkalizacji biomasy do $\text{pH} > 12$. Ponadto, dodanie do mięsa 70% CaO pozwoliło na uzyskanie temperatury powyżej 60°C i utrzymanie jej dostatecznie długo, by wraz z wysokim pH dała gwarancję szybkiej i skutecznej higienizacji. Podobne wymagania, ustalone w ramach prawodawstwa EU, dotyczą metody inaktywacji czynników chorobotwórczych w mieszaninie wapna i obornika, gdzie za bezpieczną uznano wartość pH na poziomie co najmniej 12, pod warunkiem utrzymania jej przez 60 minut przy równoczesnej temperaturze 60°C lub przez 30 minut i 70°C . Warto podkreślić, że stałą tendencją było gwałtowne nagrzewanie się PUZP bezpośrednio po wprowadzeniu do nich CaO. Zaobserwowano również, że w mięsie z dodatkiem krwi generowana temperatura była niższa, niż w samym mięsie.

Podane wyżej wartości temperatury mogą być uważane za efektywny czynnik higienizacyjny tylko w przypadku form wegetatywnych drobnoustrojów. Z tego powodu eliminacja przetrwalników *Clostridium* w opisywanych badaniach powinna być przypisywana głównie silnej alkalizacji przetwarzanego materiału. Biorąc jednak pod uwagę fakt, że przy zbliżonym pH, zdecydowanie najszybszą inaktywację spor zaobserwowano w przypadku charakteryzującej się najwyższą temperaturą kombinacji doświadczalnej (mięso+70% CaO) znaczenie warunków termicznych jako elementu uzupełniającego inhibicyjny wpływ wysokiego odczynu na przetrwalniki nie powinno podlegać dyskusji.

Wnioski: Praktyczne wykorzystanie wapnowania w celu higienizacji produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego, podobnie jak omawiane wcześniej kompostowanie, umożliwiłoby uniezależnienie ich producentów od zakładów przetwarzających je przy pomocy metod usankcjonowanych przez Unię Europejską. Wyniki przedstawionych prac wskazują, że zastosowanie odpowiedniej dawki wysokoreaktywnego CaO pozwala na szybkie wyeliminowanie z biomasy mikroorganizmów patogennych, zarówno tych w formie wegetatywnej, jak i przetrwalnej. Możliwość regulacji pH gleby na skutek wprowadzenia do niej uzyskanego w ten sposób produktu końcowego, powinna czynić tę metodę higienizacji szczególnie wartościową w warunkach uprawy roślin na polskich, z reguły kwaśnych glebach.

Poza aspektem aplikacyjnym przeprowadzonych badań, pozwoliły one również na sformułowanie istotnych postulatów dotyczących założeń metodycznych. W próbkach analizowanych po neutralizacji pH, efektywność reizolacji mikroorganizmów była wyższa, niż w tych, które badano bezpośrednio po pobraniu, z pominięciem buforowania. Zjawisko wymaga z pewnością uwzględnienia przy planowaniu doświadczeń mikrobiologicznych z udziałem związków silnie modyfikujących pH.

2.2.3. Zakwaszanie jako metoda przetwarzania produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do wykorzystania rolniczego ograniczająca ryzyko skażenia środowiska.

Inhibicyjny wpływ obniżonego pH na rozwój większości drobnoustrojów typowych dla środowisk o odczynie zbliżonym do obojętnego znalazł powszechne wykorzystanie chociażby w procesach konserwacji żywności czy pasz. Zakwaszenie powoduje również skuteczne zahamowanie kiełkowania przetrwalników występujących w produktach spożywczych patogenów, przede wszystkim tych z rodzaju *Clostridium* (np. *C. botulinum*). Zastosowanie tej metody do higienizacji produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego może jednak wykazywać niewystarczającą skuteczność, a przetworzony w ten sposób

materiał stwarzać poważne zagrożenie, zwłaszcza gdy wykorzystywany jest jako składnik paszy dla zwierząt. W pracy nr 5, wchodzącej w skład prezentowanego osiągnięcia naukowego, postanowiono zbadać łączny wpływ niskiego pH i podwyższonej temperatury na przetrwalniki *C. sporogenes* w odpadach mięsnych i rybnych. Efekt taki uzyskano dodając do zaszczepionej sporami biomasy kwas mrówkowy (uzyskane pH - ok. 4) i podgrzewając ją w temperaturze o różnych wartościach.

Wyniki badań potwierdzają umiarkowaną skuteczność procesu higienizacji opartego wyłącznie na działaniu kwasu mrówkowego, bowiem różnice liczebności przetrwalników *C. sporogenes* w niepoddanym działaniu ciepła materiale surowym i zakwaszonym były niewielkie i nie przekraczały wartości 1 log. Z kolei podgrzewanie zakwaszonej biomasy dawało znacznie lepsze efekty w przypadku odpadów mięsnych. Zaobserwowano, że po 6. godzinach kwaszenia wprowadzone do nich przetrwalniki reagowały spadkiem liczebności rzędu 3 log już po półgodzinnym ogrzaniu w 80°C. W odpadach rybnych podobne warunki powodowały niespełna 1 log redukcję liczby spor. Wariant ekstremalny doświadczenia, zakładający ogrzewanie PUZP w temperaturze 90°C po 48 godzinach działania kwasu, potwierdził tę tendencję. O ile w biomase mięsnej już po 15 minutach nie wykrywano spor, w rybnej po 30 minutach ich liczba wynosiła $1,01 \times 10^3$ jtk·g⁻¹. Biorąc pod uwagę fakt wysokiej ciepłooporności przetrwalników *C. sporogenes*, ich eliminacja w temperaturze 80°C (mięso) musiała wynikać z komplementarnego oddziaływania niskiego pH.

Wnioski: Produkty uboczne powstające w przemyśle mięsnym i rybnym mogą być wykorzystywane jako wysokowartościowa karma dla zwierząt gospodarskich. Od momentu, gdy takie praktyki żywieniowe uznane zostały za bezpośrednią przyczynę epidemii TSE u bydła, problem niewystarczającej higienizacji podawanej zwierzętom paszy nabrał szczególnego znaczenia. Z prezentowanych badań własnych wynika, że kwaszenie PUZP w połączeniu z działaniem wysokiej, ale nieprzekraczającej 100°C temperatury może skutecznie wyeliminować z biomasy nawet te drobnoustroje, które zdolne są do wytwarzania odpornych na działanie czynników stresogennych form przetrwalnych. Daje to gwarancję likwidacji w przetwarzanym materiale patogenów np. z rodziny *Enterobacteriaceae*. Doświadczenie dowiodło również, że ustalając parametry tej metody higienizacji, konieczne jest wzięcie pod uwagę właściwości biomasy poddawanej jej działaniu – w zależności od jej pochodzenia efektywność procesu może ulegać dużym zmianom.

2.2.4. Oddziaływanie promieniowania mikrofalowego jako metoda przetwarzania produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do wykorzystania rolniczego ograniczająca ryzyko skażenia środowiska.

Przetworzone produkty uboczne pochodzenia zwierzęcego, dzięki wysokiej zawartości białka stanowić mogą cenny składnik karm dla zwierząt gospodarskich. Do szczególnie cenionych materiałów zaliczane są mączki rybne, które ze względu na źródło pochodzenia uważane są za paszę względnie bezpieczną i nie stwarzającą zagrożeń porównywalnych do maczek kostnych i mięsno-kostnych pozyskiwanych ze zwierząt lądowych. Metoda ich wytwarzania zapewnia teoretyczną inaktywację występujących w materiale wyjściowym patogenów, jednak również gotowy produkt może ulec wtórnemu skażeniu i, jako bogata w składniki odżywcze pożywka, zapewnić optymalne warunki do namnażania się drobnoustrojów chorobotwórczych.

Testowana w publikacji nr 6 metoda higienizacji maczek rybnych (dorszowa i łososiowa) z wykorzystaniem promieniowania mikrofalowego może znaleźć zastosowanie w sytuacji już stwierdzonego skażenia danej partii materiału, bądź posłużyć jako metoda prewencyjna, zapobiegająca jego ewentualnej kontaminacji przez patogeny. Organizmami wskaźnikowym w przeprowadzanych badaniach były pałeczki *E. coli* i *Salmonella* spp., enterokoki, oraz spory *C. sporogenes*, w przypadku których zastosowano znacznie wyższe dawki promieniowania. Wśród bakterii występujących w postaci form wegetatywnych największą wrażliwość na działanie mikrofal wykazywały pałeczki *E. coli*, które w mączce dorszowej ginęły już po zastosowaniu dawki $30 \text{ kJ} \times \text{g}^{-1}$. Z kolei najbardziej odporne okazały się enterokoki, wykrywane w obu typach maczek nawet po aplikacji dawki $225 \text{ kJ} \times \text{g}^{-1}$. W przypadku spor *C. sporogenes* obliczone teoretyczne dawki promieniowania gwarantujące ich eliminację wynosiły ok. $2\,000 \text{ kJ} \times \text{g}^{-1}$ w mączce z dorsza i $1600 \text{ kJ} \times \text{g}^{-1}$ w mączce z łososia. Rodzaj mączki rybnej wpływał na przeżywalność bakterii, jednak zaobserwowane tendencje nie były jednoznaczne. Pałeczki *Salmonella* spp., *E. coli* i enterokoki izolowano dłużej z napromieniowanej mączki z łososia, natomiast spory *Clostridium* - z mączki z dorsza.

Wnioski: Metoda higienizacji maczek rybnych przy użyciu promieniowania mikrofalowego, w odróżnieniu od omawianych wcześniej kompostowania czy wapnowania, wymaga zaangażowania bardziej skomplikowanej aparatury. Jej ewentualne wdrożenie z całą pewnością dotyczyłoby wybranych zakładów przetwórczych, w których urządzenia do napromieniowania mogłyby stanowić element uzupełniający ich wyposażenia, uruchamiany tylko w sytuacjach potencjalnego zagrożenia. Niewątpliwą zaletą wykorzystania tej technologii właśnie w stosunku do maczek jest homogenna struktura tych produktów,

umożliwiająca ich równomierną dystrybucję oraz regulację i kontrolę grubości warstwy poddawanej promieniowaniu. Udowodniona w badaniach skuteczność bakteriobójcza i relatywnie krótki czas trwania procesu, stanowiąc mogą dodatkowe argumenty przemawiające na jego korzyść.

2. 3. Podsumowanie.

Wybór tematyki badawczej prac wchodzących w cykl osiągnięcia naukowego wynikał bezpośrednio z ogromnego zapotrzebowania na opracowanie nowych – skutecznych, a zarazem prostych i relatywnie tanich - metod przetwarzania PUZP przeznaczonych do wykorzystania rolniczego. Wyrazem tego zapotrzebowania było, między innymi, uwzględnienie w regulacjach prawnych UE możliwości zgłaszania tzw. metod alternatywnych przetwarzania PUZP, które po poddaniu walidacji mogłyby być dopuszczone do stosowania na szerszą skalę.

Analizowane w badaniach własnych czynniki o działaniu letalnym lub statycznym w stosunku do drobnoustrojów (wysoka temperatura, różne związki chemiczne, mikrofały) wykorzystywane są powszechnie w procesach dezynfekcji i sterylizacji. Stosując je w celu higienizacji PUZP postanowiono sprawdzić, czy w przypadku tak specyficznego materiału potencjał inhibicyjny tych czynników wobec mikroorganizmów nie ulegnie redukcji. Bezsporne potwierdzenie tej skuteczności pozwoliło zrealizować cel naukowy badań, zakładający wzbogacenie wiedzy dotyczącej reakcji patogenów jelitowych i przetrwalników bakterii na działanie różnych czynników zewnętrznych w warunkach nietypowych. Uzyskane wyniki dostarczyły rzetelnych danych mogących stanowić podstawy do opracowania nowych technologii przetwarzania PUZP, alternatywnych zwłaszcza wobec generujących wysokie koszty i wymagających specjalistycznego sprzętu metod termicznych.

Wyniki badań prezentowane były w formie posteru p.t. Wpływ promieniowania mikrofalowego na eliminację wybranych patogenów w mączce rybnej na XXXVIII Międzynarodowym Seminarium Naukowo - Technicznym „Chemistry for Agriculture” w Karpaczu (2013) oraz w formie referatu p.t. Inhibicyjny wpływ czynników fizyko-chemicznych na spory *Clostridium sporogenes* w odpadach organicznych na Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej „Działania przeciwdrobnoustrojowe. Drobnoustroje - Wpływ czynników fizycznych i chemicznych.” w Bydgoszczy (2015).

2.4. Najważniejsze osiągnięcia wynikające z uzyskanych wyników.

1. Po raz pierwszy w Polsce poddano szczegółowej analizie inhibicyjny wpływ alkalizacji, zakwaszenia oraz promieniowania mikrofalowego na mikroorganizmy wskaźnikowe w produktach ubocznych pochodzenia zwierzęcego i produktach pochodnych przeznaczonych do wykorzystania rolniczego.
2. Po raz pierwszy w Polsce w badaniach dotyczących higienizacji PUZP wykorzystano przetrwalniki *Clostridium sporogenes*.
3. Dowiedziono, że w procesach higienizacji PUZP przeprowadzanych z wykorzystaniem CaO, czynnikiem decydującym o ich skuteczności było raczej wysokie, przekraczające wartość 12, pH materiału, niż wygenerowana temperatura. Najwyższa efektywność antybakteryjna charakteryzowała połączone działanie obu tych czynników.
4. Udowodniono niską skuteczność działania kwasu mrówkowego jako jedyne go czynnika redukcji liczby mikroorganizmów zasiedlających PUZP. Natomiast kwaszenie PUZP w połączeniu z działaniem wysokiej, ale nieprzekraczającej 100°C temperatury daje gwarancję likwidacji patogenów w przetwarzanym materiale.
5. Po raz pierwszy w Polsce zbadano wpływ promieniowania mikrofalowego na drobnoustroje wskaźnikowe w mączkach rybnych.
6. Dowiedziono, że zastosowane w badaniach czynniki mogą skutecznie wyeliminować z produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do wykorzystania rolniczego drobnoustroje zarówno w formie wegetatywnej, jak i przetrwanej.

III. Charakterystyka pozostałej aktywności naukowej.

3.1. Omówienie zainteresowań naukowo-badawczych i pozostałych osiągnięć.

Rozpoczynając pracę na stanowisku asystenta w ówczesnej Katedrze Mikrobiologii włączona zostałam w cykl badań związanych z mikrobiologią gleby. Badania dotyczyły zarówno liczebności drobnoustrojów, jak i ich wzajemnych relacji - zwłaszcza tych o charakterze antagonistycznym. Część doświadczeń była bezpośrednio związana z tematem mojej pracy magisterskiej p.t. Wpływ różnych systemów zmianowania na zdrowotność grochu pastewnego odmiany „Fidelia”, realizowanej w ówczesnej Katedrze Fitopatologii. Oddziaływanie uprawy grochu pastewnego w monokulturze, zmianowaniu uproszczonym i tradycyjnym na stan fitosanitarny gleb stanowiło również przedmiot badań

mikrobiologicznych prowadzonych w Katedrze Mikrobiologii na terenie pól doświadczalnych RZD Mochełek. Ich wyniki potwierdziły negatywny wpływ długoletniej monokultury na występowanie w glebie promieniowców z rodzaju *Streptomyces* – mikroorganizmów, które dzięki wytwarzanym przez siebie antybiotykom odgrywają ogromną rolę w procesach kształtowania składu gatunkowego zespołu mikroorganizmów glebowych (B.2).

Podobne tendencje zaobserwowano również w przypadku mykoantagonistycznych bakterii z rodzaju *Arthrobacter* i *Pseudomonas*. Równocześnie ze spadkiem ich liczebności wzrastała liczba fitopatogennych grzybów z rodzaju *Pythium* i *Fusarium* (B.4).

Oprócz typowych analiz ilościowych poszczególnych grup drobnoustrojów glebowych, badano również właściwości wybranych gatunków pod względem ich aktywności antagonistycznej. Mechanizmy tego zjawiska opierają się przede wszystkim na działaniu wydzielanych do środowiska substancji antybiotycznych, enzymów lub związków ograniczających dostępność kluczowych dla rozwoju patogenów substancji odżywczych. W przeprowadzonych badaniach określano potencjał antagonistyczny izolowanych z gleby szczepów *Pseudomonas* spp. i *Streptomyces* spp. Zaobserwowano, że ich hodowla na pożywce stałej hamowała wzrost grzybni zaszczipionych na tym samym podłożu *Fusarium culmorum* i *F. solani* oraz *Rhizoctonia solani* (B.1, B.2).

Zjawisko antagonizmu, postrzegane z reguły jako środek w walce z patogenami roślin, może mieć również znaczenie negatywne. W sytuacji, gdy mikroorganizm chorobotwórczy jest w stanie zahamować rozwój swojego antagonisty, może doprowadzić do znacznego ograniczenia lub całkowitego wyeliminowania jego populacji z zasiedlanego przez konkurujące gatunki agroekosystemu. Potwierdziły to wyniki doświadczenia dotyczącego wpływu patogennych bakterii z rodzaju *Erwinia* na grzyby z rodzaju *Trichoderma* (B.3).

Wszystkie badania laboratoryjne mające na celu ocenę wzajemnych oddziaływań pomiędzy różnymi grupami mikroorganizmów glebowych dowiodły również, że wpływ na kształtowanie się tych relacji miała temperatura hodowli oraz rodzaj zastosowanego podłoża hodowlanego, ze szczególnym uwzględnieniem jego odczynu. Oprócz czynników zewnętrznych, intensywność oddziaływań antagonistycznych była zależna od gatunków wykorzystanych w testach drobnoustrojów. Uzyskane wyniki mogą sugerować, że ze względu na mnogość czynników modyfikujących proces inhibicji drobnoustrojów w warunkach *in vitro*, ich aktywność w środowisku glebowym nie zawsze odpowiadać będzie tej, potwierdzonej wcześniej, w laboratorium.

Umiejętność interpretacji wyników badań laboratoryjnych doskonaliłam uczestnicząc w 1997 roku w szkoleniu z zakresu biologii molekularnej zorganizowanym przez DNA-

Gdańsk i Katedrę Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej - „Metody diagnostyczne oparte na analizie DNA (PCR)”.

Od roku 2000 wiodący profil badań prowadzonych w Katedrze Mikrobiologii i Technologii Żywności uległ zmianie i ich podstawowym przedmiotem stała się mikrobiologia środowiskowa. Moje zainteresowania skupiły się wokół zagadnienia skuteczności procesów kompostowania osadów pościekowych w kontekście bezpieczeństwa mikrobiologicznego. Większość doświadczeń realizowana była w ramach grantu nr 1030/P06/2001/20 „Opracowanie mikrobiologicznych kryteriów oceny skuteczności kompostowania osadów pościekowych jako element strategii ich rolniczego wykorzystania.”, a ich wyniki stanowiły podstawę do napisania dysertacji doktorskiej oraz 20 publikacji. Część badań prowadzona była w ramach współpracy z Institut für Umwelt- und Tierhygiene Uniwersytetu Hohenheim w Stuttgarcie, a jednym z jej efektów jest publikacja „Mikrobiologisch – seuchenhygienische Untersuchungen bei der Kompostierung von Klarschlamm zur landwirtschaftlichen Verwertung.“, w której jestem współautorem (A.6).

Problem zagospodarowania osadów pościekowych dotyczy nie tylko ilości tych specyficznych, produkowanych w procesie oczyszczania ścieków odpadów, ale również ryzyka związanego z ich skażeniem przez metale ciężkie i mikroorganizmy chorobotwórcze. Ze względu na ogromny potencjał nawozowy osadów, stanowiących bogate źródło materii organicznej i związków odżywczych dla roślin, uzasadnione jest wprowadzanie ich do gleby w celu polepszenia jej struktury i zwiększenia żyzności. O ile ponadnormatywna ilość metali ciężkich automatycznie uniemożliwia wykorzystanie osadów do celów rolniczych, ryzyko mikrobiologiczne można zredukować, poddając materiał odpowiedniej metodzie przetwarzania. Prawdłowo przeprowadzony proces kompostowania jest w stanie spełnić wymagania w zakresie zapewnienia bezpieczeństwa biologicznego produktu finalnego. Niezwykle istotne jest jednak ustalenie właściwych parametrów tego procesu, z uwzględnieniem procedur pozwalających na kontrolę jego przebiegu.

Głównym celem badań była ocena mikrobiologiczna dwóch różnych metod kompostowania komunalnych osadów ściekowych przeznaczonych na cele nieprzemysłowe. Najistotniejszym elementem różniącym te technologie był system napowietrzania biomasy – mechaniczny, przez jej cykliczne przerzucanie oraz aktywny, polegający na wymuszeniu obiegu powietrza wewnątrz pryzmy przez system perforowanych rur, podłączonych do zewnętrznego urządzenia zasysającego. Ponadto analizowano wpływ składników kompostowanej biomasy i ich proporcji na tempo higienizacji, zależność procesu od warunków zewnętrznych oraz różnice w efektywności inaktywacji drobnoustrojów w różnych

strefach pryzmy. Mikroorganizmy wskaźnikowe wykorzystane do tego celu to pałeczki *E. coli* i *Salmonella* Senftenberg W775 oraz enterokoki, wprowadzane do pryzm wewnątrz nośników zaszczipionych zawiesinami poszczególnych gatunków o gęstości rzędu $10^8 \text{NPL} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Rezultaty przeprowadzonych badań dowiodły wyższej skuteczności higienizacyjnej kompostowania w pryzmach napowietrzanych w sposób mechaniczny. Było to bezpośrednim efektem braku fazy termofilnej w pryzmach niedostatecznie napowietrzonych systemem perforowanych rur (A.5, A.6, A.9, A.10, A.11, A.19). Różnice w przeżywalności mikroorganizmów testowych były bardzo duże (B.6). W jednym z cykli doświadczalnych enterokoki w kompostowanych osadach przerzucanych mechanicznie eliminowane były już po 7 dniach, a w pryzmach z aeracją wymuszoną – od 51 do 145 dni, w zależności od składu biomasy (B.10).

Dobór komponentów wchodzących w skład pryzm miał również istotne znaczenie dla przebiegu procesu kompostowania. Mimo, iż ogólny udział materiałów strukturotwórczych w biomasie była zbliżony, kluczowy okazał się rodzaj tych dodatków. W większości cykli doświadczalnych szybsza inaktywacja drobnoustrojów obserwowana była w pryzmie z większą ilością trocin, niż słomy (B.5, B.7). Zależności te miały jednak bardziej złożony charakter, bowiem w cyklach charakteryzujących się wysoką temperaturą zewnętrzną, kompozycja biomasy miała mniejszy wpływ na tempo eliminacji mikroorganizmów, zwłaszcza w pryzmach napowietrzanych mechanicznie.

Komplementarne, w stosunku do warunków termicznych wewnątrz pryzm, działanie wysokiej temperatury zewnętrznej nie było zjawiskiem zaskakującym – doświadczenia prowadzone latem, bądź w czasie cieplej jesieni dawały lepsze efekty w zakresie likwidacji patogenów. W cyklach zimowych możliwe było osiągnięcie satysfakcjonujących wyników, jednak problemem była długa przeżywalność bakterii wskaźnikowych w warstwach peryferyjnych pryzmy (A.14). Zależność tempa inaktywacji od lokalizacji nośników bakteryjnych w pryzmie obserwowano również w wielu innych badaniach – umiejscowienie ich w górnej lub centralnej części dawało znacznie większe szanse na pełną eliminację bakterii wskaźnikowych (A.5, A.7, A.14).

Rezultaty większości doświadczeń wskazywały, że spośród badanych mikroorganizmów to enterokoki charakteryzowały się najwyższą odpornością na warunki panujące w biomasie w trakcie procesu kompostowania (A.19, B.5).

Część badań dotyczących efektywności higienizacyjnej procesu kompostowania polegała na analizie jego wpływu na enterokrwotoczny szczep *E. coli* (EHEC).

Doświadczenia przeprowadzono z wykorzystaniem specjalnie skonstruowanych nośników Filter-Sandwich, uniemożliwiających kontaminację środowiska zewnętrznego (A.8, B.8). Ich rezultaty potwierdzają wcześniejsze obserwacje - szybszą inaktywację bakterii w okresach wysokiej temperatury zewnętrznej oraz w pryzmach napowietrzanych mechanicznie, jak również niedostateczną redukcję liczebności patogenów w zewnętrznych częściach pryzm.

Powtarzalność wyników uzyskanych w wielu cyklach doświadczalnych stanowiła potwierdzenie wartości aplikacyjnej użytych metod badawczych, opartych o zastosowanie nośników bakteryjnych do walidacji mikrobiologicznej procesów kompostowania osadów pościekowych. W przeciwieństwie do stosowanej z reguły bezpośredniej kontroli inaktywacji patogenów przez określanie ich liczebności w materiale przed i po poddaniu go danej technologii przetwarzania, w badaniach wykorzystano monitoring pośredni. Metoda jest oparta na okresowej obserwacji liczebności drobnoustrojów wprowadzonych w nośnikach w różne miejsca pryzmy, pozwala na ciągłą mikrobiologiczną kontrolę procesu i jest w stanie zagwarantować otrzymanie właściwego pod względem higienicznym produktu dla celów rolniczych. Ponadto, dzięki wysokiej liczebności początkowej mikroorganizmów wskaźnikowych, umożliwia prognozowanie jakości higienicznej utylizowanego produktu w przypadku hipotetycznego ekstremalnego skażenia materiału.

Ponieważ w dostępnej literaturze nie znaleziono publikacji opisujących badania prowadzone z wykorzystaniem tej metody, można uznać, że prace własne stanowiły nowatorskie podejście do sposobu walidacji mikrobiologicznej skuteczności procesu kompostowania.

Uzyskane wyniki stanowić mogą rzetelne podstawy do opracowania lub optymalizacji parametrów kompostowania w jednostkach wykorzystujących tę metodę w celu przetwarzania osadów pościekowych. Ich aplikacja przyczynić się może do ograniczenia transmisji patogenów do gleby i wód gruntowych w efekcie stosowania osadów do celów rolniczych, minimalizując wynikające z tego zagrożenia środowiskowe.

W ramach cyklu badań nad procesem kompostowania przeanalizowano również jego wpływ na ogólną liczbę autochtonicznych bakterii mezo- i termofilnych oraz termofilnych grzybów, bakterii przetrwalnikujących i promieniowców (A.20, A.21). Uzyskane wyniki dowiodły relatywnie niewielkiego oddziaływania kompostowania na wielkość populacji badanych drobnoustrojów. Największą wrażliwością na niekorzystne warunki panujące w pryzmie charakteryzowały się grzyby termofilne, których koncentracja w końcowym terminie analiz była niższa od początkowej o ok. 2 log.

Mimo, iż zagadnienia z zakresu mikrobiologii środowiskowej wyznaczają główny nurt tematyczny badań realizowanych w Katedrze, prowadzone są również doświadczenia nie związane z tą problematyką w sposób bezpośredni. W ramach części z nich, dotyczącej mikrobiologii żywności, realizowano badania, których przedmiot stanowiły interakcje między bakteriami fermentacji mlekowej (LAB) z rodzaju *Lactobacillus* i patogenami jelitowymi z rodziny *Enterobacteriaceae*.

Pałeczki *Lactobacillus*, poza zdolnością do przeprowadzania fermentacji mlekowej, znane są szeroko dzięki ich właściwościom probiotycznym. Udoskonalone biotechnologicznie szczepy wykorzystywane są, po wcześniejszym opatentowaniu, przez firmy przemysłu spożywczego i farmaceutycznego do wzbogacania żywności lub produkcji suplementów diety, zalecanych w trakcie terapii antybiotykowej. Ich pozytywny wpływ na funkcjonowanie przewodu pokarmowego człowieka został potwierdzony naukowo i spowodował zainteresowanie pozyskiwaniem nowych szczepów, charakteryzujących się wysokim potencjałem probiotycznym.

W badaniach zastosowano metodę kultur mieszanych, polegającą na hodowli bakterii patogennej i hipotetycznie probiotycznej na podłożu płynnym, umożliwiającym równoczesny wzrost obu drobnoustrojów. Izolaty pałeczek fermentacji mlekowej pochodziły z kolekcji Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej (*L. plantarum* 0858) lub zostały pozyskane w wyniku posiewu z materiału roślinnego. Należące do rodziny *Enterobacteriaceae* patogeny z rodzaju *Salmonella*, *Shigella* i *Proteus* udostępnił Uniwersytet Hohenheim w Stuttgarcie. Ocena oddziaływania *Lactobacillus* na poszczególne enterobakterie opierała się na określeniu ich liczebności po wspólnej hodowli, prowadzonej w różnych przedziałach czasowych. Wykorzystując możliwości zastosowanej metody doświadczalnej, zdecydowano się również na przeanalizowanie ewentualnego wpływu patogenów na testowane LAB. Pozwoliło to na uzyskanie kompletnego obrazu interakcji zachodzących między badanymi drobnoustrojami i, jak wykazały ostateczne wyniki, wyeliminowanie działania patogenów, jako czynnika powodującego możliwe wahania liczebności pałeczek fermentacji mlekowej.

Rezultaty serii doświadczeń dotyczących antagonistycznego wpływu *Lactobacillus* na pałeczki *Salmonella* Senftenberg W775 dowiodły szczególnie wysokiej aktywności wyizolowanego z materiału roślinnego szczepu pałeczek fermentacji mlekowej oznaczonego jako *Lactobacillus* 4, który prowadził do inaktywacji *Salmonella* już po ok. 32 godzinach (A.16). Silny antagonizm w stosunku do tych bakterii potwierdzony został również w przypadku pozostałych izolatów pochodzenia roślinnego, które już we wstępnej, 48-godzinnej

fazie badań, redukowały liczebność pałeczek *Salmonella* w hodowlach mieszanych z wartości rzędu 10^7 jtk·ml⁻¹ do zera. W tych samych warunkach *L. plantarum* 0858 powodował spadek ich liczby sięgający zaledwie 2 log. Zbliżone pod względem ilościowym, relatywnie słabe oddziaływanie tego szczepu w stosunku do enterobakterii należących do rodzaju *Shigella* i *Proteus* potwierdzone zostało w kolejnej serii doświadczeń nad właściwościami antagonistycznymi LAB (A.17). Najszybszą inaktywację patogenów zaobserwowano w efekcie ich hodowli mieszanej ze szczepem *Lactobacillus* 3, przy czym pałeczki *Proteus* okazały się mniej wrażliwe na jego inhibicyjne oddziaływanie, niż *Shigella* - eliminowana całkowicie już po 21. godzinach inkubacji. Tendencja dotycząca różnicy w odporności tych dwóch rodzajów patogenów znalazła również potwierdzenie w kombinacjach doświadczalnych z wykorzystaniem pozostałych LAB.

Kontynuując prace nad potencjałem antagonistycznym bakterii fermentacji mlekowej w stosunku do pałeczek *Salmonella*, w oparciu o podobną metodykę przeprowadzono doświadczenie z wykorzystaniem kolejnych 4. szczepów *Lactobacillus* (A.22). Nawiązując współpracę z dr Iwoną Motyl z Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej oznaczono je przy pomocy testu API 50 CHL. Wszystkie testowane izolaty – *Lactobacillus* sp. (LK1), *L. brevis* (LK2) i *L. plantarum* (LK3 i LK4) powodowały eliminację pałeczek *S. Senftenberg* w ciągu 32 godzin, jednak największy spadek ich liczebności osiągnięto na skutek wspólnej hodowli ze szczepem *L. plantarum* LK4 - 6 log w ciągu 16 godzin. Podobnie jak w poprzednich badaniach, *Salmonella* nie wpływała hamująco na wzrost pałeczek fermentacji mlekowej.

Potwierdzone właściwości antagonistyczne szczepów pałeczek fermentacji mlekowej to tylko jeden z elementów niezbędnych do uznania danego izolatu za probiotyczny. Dodatkowo musi on być przebadany pod względem np. zdolności do adhezji na błonie śluzowej jelita czy możliwości przeżycia w niekorzystnych warunkach. Tym niemniej, zaobserwowany w badaniach silny inhibicyjny wpływ pałeczek *Lactobacillus*, izolowanych z fermentowanego materiału roślinnego na patogeny jelitowe, stanowi koronny argument dla popularyzacji produktów spożywczych poddawanych tej metodzie przetwarzania i uznania ich wartości prozdrowotnej, umożliwiającej sklasyfikowanie w ramach żywności funkcjonalnej.

W latach 2012- 2014 w Katedrze realizowany był projekt badawczy N N305 357538 „Opracowanie i zastosowanie nowych metod mikrobiologicznych w ocenie efektywności procesów uzdatniania gnojowicy świńskiej, które w następstwie jej rolniczego stosowania, ograniczają skażenie środowiska glebowego i wodnego drobnoustrojami patogennymi”,

którego byłam współwykonawcą. Podczas badań nawiązałam współpracę z dr Krzysztofem Skowronem z Katedry Mikrobiologii Collegium Medicum UMK w Toruniu.

Wprowadzenie do środowiska odchodów zwierzęcych, bez ich wcześniejszej higienizacji wiąże się z wysokim ryzykiem epidemiologicznym, wynikającym z dużego prawdopodobieństwa występowania w nich drobnoustrojów chorobotwórczych. Poddanie gnojowicy zabiegom zmniejszającym w niej zawartość tych patogenów umożliwia jej bezpieczne stosowanie do celów nawozowych. O ile kluczowym kryterium wyboru metody higienizacji gnojowicy powinna być gwarancja uzyskania produktu finalnego, który nie stwarza zagrożenia biologicznego, w praktyce równie istotne znaczenie mają kwestie ekonomiczne. Analizując realia funkcjonowania danego producenta, konieczne jest osiągnięcie kompromisu, w ramach którego uzyskaniu efektywnej higienizacji towarzyszyć będą relatywnie niskie nakłady.

Badania wykonywane w ramach projektu dotyczyły efektywności higienizacyjnej różnych metod uzdatniania gnojowicy świńskiej. Analizie poddano procesy mezofilnej (35°C) i termofilnej (50°C) fermentacji metanowej, składowania oraz napowietrzania. Mikroorganizmami wykorzystanymi jako indykatory skuteczności tych technologii były pałeczki *Salmonella* oraz enterokoki, wprowadzane do gnojowicy bezpośrednio lub wewnątrz nośników bakteriologicznych typu Filter-Sandwich.

W celu oceny efektywności higienizacyjnej fermentacji metanowej badano tempo inaktywacji pałeczek *Salmonella* Typhimurium (A.27). Doświadczenie prowadzono w skali półtechnicznej, z wykorzystaniem bioreaktora zapewniającego możliwość mieszania zawartości oraz wytworzenia i utrzymania na wymaganym poziomie temperatury wprowadzonej gnojowicy – w wariancie mezofilnym wynosiła ona 35°C, w termofilnym - 50°C. W zależności od warunków termicznych modyfikowano czas trwania doświadczenia oraz terminy pobierania próbek. Dzięki analizom statystycznym potwierdzona została istotność różnic między tempem eliminacji *Salmonella* Typhimurium przy zastosowaniu różnych temperatur fermentacji metanowej. W warunkach mezofilnych ginęły one po 3 tygodniach, natomiast w procesie termofilnym nie izolowano ich z gnojowicy już po 12 h.

O ile technologie wykorzystujące działanie podwyższonej temperatury pozwalają na osiągnięcie satysfakcjonujących rezultatów w zakresie inaktywacji patogenów, metody bazujące na naturalnych procesach biologicznych wymagają, do uzyskania podobnego efektu, znacznie dłuższego czasu. Dotyczy to, między innymi, składowania gnojowicy, najpopularniejszej z metod jej uzdatniania (A.25). Mimo niskich kosztów, nie zapewnia ona odpowiedniego stopnia redukcji zasiedlających biomasę drobnoustrojów. Potwierdziły to

wyniki badań nad tempem eliminacji enterokoków z gnojowicy składowanej w okresie letnim i zimowym. Obliczone tempo dziennej eliminacji bakterii w sezonie zimowym wyniosło 0,04 log NPL, efektem czego była ich wyjątkowo długa, bo przekraczająca 200 dni, teoretyczna przeżywalność. Latem czas ten był o połowę krótszy – wynosił około 100 dni. Zgodnie z obowiązującym w Polsce prawem, czas składowania gnojowicy powinien wynieść minimum 4 m-ce. Przeprowadzone badania dowodzą, że okres ten może być zbyt krótki, by zapewnić bezpieczeństwo wprowadzonej później do gleby gnojowicy. Ponieważ składowanie w dużym stopniu uzależnione jest od zmiennych warunków zewnętrznych, metoda powinna mieć ograniczone zastosowanie higienizacyjne.

Znacznie wyższy potencjał w zakresie inaktywacji patogenów w gnojowicy daje zastosowanie do tego celu technologii napowietrzania (A.28). Badając przeżywalność pałeczek *Salmonella* i enterokoków w trakcie napowietrzania drobnopęcherzykowego stwierdzono całkowitą eliminację wszystkich testowanych drobnoustrojów po 25. dniach. Ich liczebność w ciągu 12. dni napowietrzania ulegała redukcji rzędu 4-7 log. O ile różnice między tempem inaktywacji *S. Typhimurium* i *S. Senftenberg* 775W nie były istotne statystycznie, to odporność enterokoków na warunki fizykochemiczne panujące w przetwarzanej gnojowicy była już wyraźnie wyższa. Biorąc pod uwagę, że temperatura uzyskana w trakcie procesu nie przekroczyła 50°C, tempo inaktywacji bakterii wskaźnikowych można uznać za satysfakcjonujące. Istotną rolę w tym procesie mogły odgrywać czynniki dodatkowe, np. zmiany stężenia substancji o charakterze antybiotycznym, wahania pH, bądź konkurencyjne oddziaływanie mikroflory autochtonicznej gnojowicy. W porównaniu z metodami wykorzystującymi *stricte* termofilne zakresy temperatury, skuteczność higienizacyjna napowietrzania będzie oczywiście niższa, biorąc jednak pod uwagę aspekt ekonomiczny, w niektórych przypadkach stanowić może atrakcyjną alternatywę dla tych technologii.

Wyniki pracy dowiodły również braku zależności między sposobem introdukcji pałeczek *S. Senftenberg* 775W do gnojowicy, a szybkością ich eliminacji. Bez względu na to, czy bakterie wprowadzano do reaktora wewnątrz nośnika Filter-Sandwich, czy też wlewając zawiesinę bezpośrednio do gnojowicy, ich liczebność podlegała podobnym zmianom, nieróżniącym się statystycznie. Potwierdzenie tej tendencji stanowią również wyniki pracy, w której badano wpływ składowania i fermentacji metanowej na przeżywalność pałeczek *Salmonella* (A.24).

W latach 2014-2015 poszerzałam swoją wiedzę i doskonaliłam umiejętności praktyczne w zakresie aktualnych metod identyfikacji drobnoustrojów. W ramach

doświadczeń zainicjowanych w Katedrze Mikrobiologii i Technologii Żywności w 2014 roku, brałam udział w cyklu analiz prowadzonych w celu oznaczania bakterii chorobotwórczych z rodzaju *Escherichia* i *Listeria* z wykorzystaniem technik PCR i PCR – RFLP.

Dzięki współpracy z Katedrą Mikrobiologii CM UMK miałam możliwość poznania systemu identyfikacji mikroorganizmów Vitek 2.

3.2. Zestawienie danych naukometrycznych dotyczących dorobku naukowego.

Wartość naukometryczna 29 publikacji dokumentujących pozostałą aktywność naukową (w tym 12 opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie WoS, z czego 4 - A.16, A.18, A.24, A.26, posiadały IF w roku przyjęcia pracy do druku, a utraciły go w roku publikacji) jest następująca:

- IF na poziomie 5,410
- IF – 5-letni na poziomie 6,351
- Liczba cytowań publikacji wg bazy WoS – 40
- Indeks Hirscha wg bazy WoS – 4
- Liczba punktów: 284 pkt. wg aktualnej kategoryzacji czasopism MNiSW

Wartość naukometryczna publikacji dokumentujących osiągnięcie naukowe p.t.: Ocena efektywności wybranych metod higienizacji produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego (PUPZ) i produktów pochodnych przeznaczonych do wykorzystania rolniczego jako element strategii ograniczania transmisji patogenów do środowiska., jest następująca:

- IF na poziomie 3,129
- IF – 5-letni na poziomie 3,037
- Liczba cytowań publikacji wg bazy WoS – 4
- Indeks Hirscha wg bazy WoS – 1
- Liczba punktów: 100 pkt. wg aktualnej kategoryzacji czasopism MNiSW

Sumaryczna wartość naukometryczna działalności naukowo-badawczej (35 publikacji, w tym 18 opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie WoS) jest następująca:

- IF na poziomie 8,539
- IF – 5-letni na poziomie 9,388
- Liczba cytowań publikacji wg bazy WoS – 44 (30 bez autocytowań)
- Indeks Hirscha wg bazy WoS – 4
- Liczba punktów: 384 pkt. wg aktualnej kategoryzacji czasopism MNiSW

3.3. Nagrody.

Nagrody J.M. Rektora UTP za działalność naukową na Wydziale Rolnictwa i Biotechnologii są przyznawane wyłącznie wg rankingu danych naukometrycznych. Nagrody otrzymałam w latach: 2003, 2004, 2011, 2012, 2013, 2014.

Justyna Baura-Karwowska