

Anna Berthold-Pluta z d. Kazimierczak  
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Wydział Nauk o Żywności  
Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności  
Zakład Biotechnologii Mleka

## **ZAŁĄCZNIK 3a**

**Autoreferat z opisem osiągnięć naukowych  
związanych z postępowaniem habilitacyjnym**

*Warszawa, 2019 r.*

## Spis treści

1. Dane osobowe .....	3
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej .....	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych .....	3
4. Wskazanie osiągnięcia stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego .....	4
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego .....	4
4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia stanowiącego podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego .....	4
5. Syntetyczne omówienie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego .....	6
Wstęp .....	6
5.1. Cel i zakres badań .....	10
5.2. Występowanie i charakterystyka bakterii z rodzaju <i>Cronobacter</i> w żywności pochodzenia zwierzęcego i roślinnego .....	11
5.3. Wrażliwość bakterii z rodzaju <i>Cronobacter</i> na olejki eteryczne i substancje pochodzenia roślinnego .....	21
5.4. Podsumowanie najważniejszych wyników będących przedmiotem osiągnięcia naukowego ....	26
6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych .....	34
6.1. Występowanie i charakterystyka <i>Bacillus cereus</i> w mleku surowym i środowisku jego pozyskiwania .....	35
6.2. Wpływ różnych czynników na możliwości rozwoju i tworzenia toksyny HBL przez <i>Bacillus cereus</i> .....	38
6.3. Możliwości rozwoju <i>Bacillus cereus</i> w warunkach symulujących pasaż żółdkowo-jelitowy ....	42
6.4. Wybrane aspekty technologiczne i jakościowe produkcji serów typu holenderskiego ze szczególnym uwzględnieniem serów o obniżonej zawartości tłuszczu .....	47
6.5. Wybrane aspekty bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności .....	50
6.6. Aktualne zainteresowania naukowo-badawcze .....	51
6.7. Podsumowanie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych .....	52
7. Inne osiągnięcia związane z aktywnością dydaktyczną i organizacyjną .....	56
7.1. Działalność dydaktyczna .....	56
7.2. Działalność organizacyjna .....	59
7.3. Działalność w towarzystwach naukowych i zespołach eksperckich .....	60
7.4. Otrzymane nagrody i wyróżnienia .....	60
7.5. Współpraca z ośrodkami naukowymi polskimi i zagranicznymi, recenzje publikacji .....	60
7.6. Współpraca z przemysłem .....	61
7.7. Osiągnięcia w zakresie popularyzacji nauki .....	63

## 1. Dane osobowe

Imię i nazwisko: Anna Berthold-Pluta z d. Kazimierczak

Miejsce pracy: Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Wydział Nauk o Żywności  
Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności  
Zakład Biotechnologii Mleka  
ul. Nowoursynowska 159C  
02-776 WARSZAWA

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

03.07.1996 r. - stopień magistra inżyniera nauk rolniczych Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Technologii Żywności, specjalizacja: technologia mleka, praca magisterska pt. „*Jakość mikrobiologiczna serów podpuszczkowych dojrzewających*”, promotor: prof. dr hab. Irena Molska,

12.07.2002 r. - stopień doktora nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia człowieka Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Technologii Żywności, praca doktorska pt. "*Występowanie i charakterystyka Bacillus cereus w mleku i środowisku jego pozyskiwania*", promotor: prof. dr hab. Irena Molska.

## 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Po ukończeniu studiów od 01.10.1996 r. byłam zatrudniona początkowo jako asystent, a następnie na stanowisku adiunkta (od 15.10.2002 r.) w Zakładzie Technologii Mleka (obecnie Biotechnologii Mleka) na Wydziale Nauk o Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Na tym stanowisku jestem zatrudniona aktualnie.

Przerwy w pracy:

urlop macierzyński: 29.09.2010 - 01.03.2011 r.

urlop wychowawczy: 01.03.2013 - 30.09.2013 r.

## 4. Wskazanie osiągnięcia stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego

### 4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Osiągnięciem naukowym wynikającym 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. z 2017 r. poz. 1789) jest cykl publikacji naukowych pt.:

### Występowanie w żywności i charakterystyka bakterii z rodzaju *Cronobacter*

### 4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia stanowiącego podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego:

**H1. Berthold-Pluta A.,** Pluta A., Stasiak-Róžańska L., Garbowska M. (2018): Members of the *Cronobacter* genus – characteristics and prevalence in food. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych 594, 3–15; MNiSW<sub>2018</sub> = 13 pkt, IF<sub>2018</sub> = 0,0

*Indywidualny wkład: autor korespondencyjny, koncepcja przeglądu piśmiennictwa, wiodąca rola w napisaniu manuskryptu i jego korekcie po recenzjach (75%).*

**H2.** Stasiak-Róžańska L., Garbowska M., **Berthold A.,** Molska I., Ciepielewska-Janias J. (2010): Jakość mikrobiologiczna preparatów do żywienia niemowląt i małych dzieci ze szczególnym uwzględnieniem *Enterobacteriaceae* i *E. sakazakii*, Medycyna Weterynaryjna (66)9, 622-625; MNiSW<sub>2010</sub> = 9 pkt, IF<sub>2010</sub> = 0,0

*Indywidualny wkład: udział w planowaniu doświadczeń, wykonanie części badań, uczestniczenie w napisaniu manuskryptu i wykonaniu korekty artykułu, wynikającej z przedstawionych recenzji (55%).*

**H3.** Garbowska M., **Berthold-Pluta A.,** Stasiak-Róžańska L. (2015): Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter* spp., Food Microbiology 49, 1-5; MNiSW<sub>2015</sub> = 35 pkt, IF<sub>2015</sub> = 3,682

*Indywidualny wkład: koncepcja pracy, wiodący udział w planowaniu doświadczeń, przeprowadzeniu badań, sformułowaniu wniosków i współudział w przygotowaniu manuskryptu (60%).*

**H4. Berthold-Pluta A.,** Garbowska M., Stefańska I., Pluta A. (2017): Microbiological quality of selected ready-to-eat leaf vegetables, sprouts and non-pasteurized fresh fruit-vegetable juices including the presence of *Cronobacter* spp. Food Microbiology 65, 221-230; MNiSW<sub>2017</sub> = 35 pkt, IF<sub>2017</sub> = 4,090

*Indywidualny wkład: autor korespondencyjny, koncepcja pracy, zaplanowanie doświadczeń, przeprowadzenie części badań, opracowanie wyników i sformułowanie wniosków, wiodąca rola w napisaniu manuskryptu i jego korekcie po recenzjach (75%).*

**H5. Berthold-Pluta A., Stasiak-Różańska L., Pluta A., Garbowska M. (2018):** Antibacterial activities of plant-derived compounds and essential oils against *Cronobacter* strains. European Food Research and Technology 245, 1137-1147 (doi: 10.1007/s00217-018-3218-x); MNiSW<sub>2018</sub> = 30 pkt, IF<sub>2018</sub> = 1,919

*Indywidualny wkład: autor korespondencyjny, koncepcja pracy, zaplanowanie doświadczeń, przeprowadzenie badań, opracowanie wyników i sformułowanie wniosków, wiodąca rola w napisaniu manuskryptu i jego korekcie po recenzjach (80%).*

**Sumaryczny IF** prac stanowiących podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego wynosi **9,691**

**Sumaryczna liczba punktów według punktacji MNiSW** prac stanowiących podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego wynosi **122**

## 5. Syntetyczne omówienie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego

### Wstęp

Bakterie z rodzaju *Cronobacter* są ruchliwymi, względnie beztlenowymi, Gram-ujemnymi pałeczkami z rodziny *Enterobacteriaceae* [Forsythe i wsp. 2014]. Historia tego rodzaju jest stosunkowo krótka, gdyż dopiero w 2007 r. organizmy wcześniej klasyfikowane na podstawie cech fenotypowych jako *Enterobacter sakazakii* (a jeszcze wcześniej jako wytwarzające żółty pigment *Enterobacter cloacae*) zostały przypisane do nowego rodzaju *Cronobacter*, obejmującego początkowo cztery, a rok później - już pięć następujących gatunków: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii* i *C. dublinensis* [Iversen i wsp. 2006, 2007, 2008]. Badania Joseph i wsp. [2012] doprowadziły do wyróżnienia dwóch kolejnych gatunków *C. condimenti* i *C. universalis*. Ze względu na zmiany w systematyce omawianych drobnoustrojów, na potrzeby analizy danych piśmiennictwa sprzed 2007/2008 r., przyjmuje się, że określenie "*Enterobacter sakazakii*" odpowiada "bakteriom z rodzaju *Cronobacter*".

Forsythe [2018] na podstawie znaczenia klinicznego podzielił rodzaj *Cronobacter* na trzy grupy. Grupa 1 obejmuje gatunki *C. sakazakii* i *C. malonaticus*, które izoluje się najczęściej z przypadków klinicznych zarówno od niemowląt, jak i osób starszych. Również w grupie 2, obejmującej *C. turicensis* i *C. universalis*, są izolaty o znaczeniu klinicznym, ale o wiele rzadziej izolowane, natomiast na temat chorobotwórczości pozostałych trzech gatunków - *C. dublinensis*, *C. muytjensii* i *C. condimenti* niewiele jeszcze wiadomo.

Bakterie z rodzaju *Cronobacter* kojarzone są głównie z wywoływaniem poważnych infekcji u noworodków i niemowląt (zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, bakteremii i martwiczego zapalenia jelit), a szacunkowe wskaźniki śmiertelności w tej grupie sięgają nawet 80% [Nazarowec-White i Farber 1997, van Acker i wsp. 2001, Bowen i Braden 2006]. Ogólny wskaźnik infekcji wywoływanych przez bakterie z rodzaju *Cronobacter* wynosił w Stanach Zjednoczonych w latach 2003-2009 - 0,66 przypadku/100 tys. osób [Patrick i wsp. 2014]. Infekcje występują również u osób starszych, u których obejmują posocznicę, zapalenie płuc, zapalenie szpiku, infekcje ran i układu moczowego oraz ropnie śledziony [Lai 2001, Healy i wsp. 2010]. Podwyższone ryzyko wystąpienia zakażenia u dorosłych dotyczy pacjentów w trakcie terapii antybiotykowej, z obniżoną odpornością i osób starszych przewlekłe chorujących [Lai 2001, Patrick i wsp. 2014]. Źródła infekcji u dorosłych są nieznane, ale przypuszcza się, że mogą wynikać z czasowej zwiększonej wrażliwości na komensalne szczepy *Cronobacter* [Forsythe 2018].

Niewiele wiadomo na temat źródeł i dróg zakażeń innych niż w przypadku niemowląt, czyli spożycia zanieczyszczonych preparatów w proszku (powdered infant formula - PIF) [Drudy i wsp. 2006]. Jednak mikroorganizmy te izolowano także z innych źródeł, np. z gleby [Ueda 2017], od zwierząt (np. owadów) [Butler i wsp. 2010, Pava-Ripoll i wsp. 2012], ze źródeł klinicznych (np. płynu mózgowo-rdzeniowego, krwi, płwocin, ran, moczu i dróg oddechowych) [Patrick i wsp. 2014], środowiska gospodarstwa domowego i zakładów przemysłu spożywczego [Kandhai i wsp. 2004] oraz produktów spożywczych pochodzenia zwierzęcego i roślinnego [Lehner i Stephan 2004, Shaker i wsp. 2007, Brandão i wsp. 2017, Aksu i wsp. 2018, Forsythe 2018, Santo i wsp. 2018].

W trzech kolejnych dokumentach FAO-WHO [2004, 2006, 2008], poświęconych bezpieczeństwu mikrobiologicznemu preparatów w proszku do żywienia niemowląt (< 6 miesiąca życia) podzielono drobnoustroje patogenne związane z tymi produktami na trzy grupy. W grupie patogenów niosących udowodnione w pełni udokumentowane ryzyko (kategoria A) znalazły się, oprócz serowarów *Salmonella* także bakterie z rodzaju *Cronobacter*. W dokumentach tych opisano również procedury dotyczące sposobu przygotowania PIF i sposoby utrzymania higieny sprzętów stosowanych do karmienia noworodków. Należy pamiętać, że po pierwsze PIF nie są produktami jałowymi, a więc sposób przygotowania, temperatura i czas przetrzymywania preparatów po ich regeneracji powinien uniemożliwić ewentualne namnażanie się obecnych w nich drobnoustrojów. Dlatego właśnie zaleca się, aby temperatura PIF w czasie regeneracji była nie niższa niż 70°C i były przechowywane po uwodnieniu na tyle krótko, aby ograniczyć wzrost drobnoustrojów ewentualnie w nich obecnych [FAO-WHO 2004, 2006]. Po drugie, procedury powinny ograniczyć zanieczyszczenie preparatów w czasie ich przygotowania. Z badań bowiem wynika, że *Cronobacter* były izolowane ze sprzętu do podawania noworodkom pokarmu [Hurrell i wsp. 2009a]. Wiele przypadków zakażeń *Cronobacter*, do których przyczynił się brak stosowania odpowiednich praktyk przygotowywania pokarmów dla noworodków (np. niedotrzymywania odpowiednio wysokiej temperatury wody do regeneracji PIF), stwierdzono w szpitalnych oddziałach intensywnej opieki nad noworodkami [Caubilla-Barron i wsp. 2007]. W 2008 r. również Codex Alimentarius Commission (CAC) wprowadziła do zalecanych kryteriów mikrobiologicznych dla PIF także wymagania badań trzydziestu 10-gramowych próbek z partii w kierunku obecności *Cronobacter* spp. [CAC 2008].

Z badań nad mechanizmami wirulencji wynika, że bakterie z rodzaju *Cronobacter* mają zdolność przywierania do ludzkich komórek jelitowych i ich uszkodzenia, namnażania się w makrofagach i przenikania przez barierę krew-mózg [Townsend i wsp. 2007, Almajed

i Forsythe 2016]. Wykazano, że *C. sakazakii* infekuje błony śluzowe, nabłonek żołądka i jelit [Feeney i wsp. 2014a]. *C. sakazakii* wykorzystują jako źródło węgla kwas sialowy, co uważa się za istotną cechę adaptacyjną tych drobnoustrojów, gdyż kwas sialowy występuje w mleku ludzkim (także w PIF), mucynie i komórkach nerwowych [Joseph i wsp. 2013]. Zsekwencjonowanie genomów wyizolowanych szczepów *Cronobacter* ujawniło szereg czynników wirulencji, takich jak adhezyny, systemy pomp efflux, mechanizm wychwytu żelaza (geny *eitCBAD* i *iucABD/iutA*), hemolizyny typu III, flagelle i metaloproteazy. Do innych potencjalnych czynników chorobotwórczości drobnoustrojów zalicza się aktywator plazminogenu *Cronobacter* (*cpa*, proteazę błony zewnętrznej kodowaną tylko u *C. sakazakii* i *C. universalis*) oraz systemy sekrecji typu VI. W procesie przenikania komórek *Cronobacter* przez barierę krew-mózg, a także w czasie przyłączania się do komórek gospodarza istotną rolę odgrywają prawdopodobnie białka błony zewnętrznej A (OmpA) i X (OmpX) [Singh i wsp. 2015, Forsythe 2018].

Bakterie z rodzaju *Cronobacter* mogą namnażać się w szerokim zakresie temperatury, od zaledwie około 5°C do nawet 44-47°C, a optymalna temperatura wzrostu wynosi 37-39°C. Czas generacji w temperaturze pokojowej (21°C) wynosi, w zależności od szczepu, 40-94 minut [Lenati i wsp. 2008].

Bakterie z rodzaju *Cronobacter* wykazują szereg cech, które ułatwiają tym drobnoustrojom przeżycie w różnych produktach spożywczych oraz znaczną zdolność adaptacji do zmiennych warunków, panujących w czasie jej produkcji. Wśród charakterystycznych właściwości tych drobnoustrojów wymienia się przede wszystkim oporność na wysuszenie środowiska (niską aktywność wody -  $a_w$ ). O wyjątkowości pod tym względem omawianych drobnoustrojów świadczyć mogą wyniki otrzymane przez Edelson-Mammel i wsp. [2005], którzy wykazali, że *C. sakazakii* są zdolne przetrwać dwa lata w preparatach w proszku do żywienia niemowląt. Składniki mleka zwiększają możliwości przetrwania *Cronobacter* spp. w warunkach znacznie obniżonej  $a_w$  [Hu i wsp. 2018]. Gurtler i Beuchat [2007] podają, że podczas 12-miesięcznego przechowywania sztucznie zanieczyszczonych komórkami *C. sakazakii* preparatów do żywienia niemowląt populacja tych patogenów utrzymywała się na wyższym poziomie w preparatach o aktywności wody  $a_w = 0,26$  i w temperaturze 4°C niż w PIF o  $a_w = 0,44$  i w temperaturze 21°C. Tak znaczna oporność na wysuszenie wynika najprawdopodobniej z kumulowania w komórkach *Cronobacter* (zwłaszcza tych będących w fazie stacjonarnej) trehalozy, która działa jako czynnik ochronny [Feeney i wsp. 2014]. Przypuszcza się, że mechanizm reakcji na stres osmotyczny może polegać na zastąpieniu warstwy wody, która gromadzi się wokół biomolekuł, przez trehalozę, która utrzymuje nienaruszalność



trójwymiarowej struktury tych cząsteczek (z ang. "the water replacement theory") [Feeney i wsp. 2014a].

U bakterii z rodzaju *Cronobacter* zaobserwowano mechanizm oporności krzyżowej, polegającej na zwiększeniu oporności na różne czynniki stresu pod wpływem wcześniejszego narażenia na różne subletalne zakresy obróbki cieplnej, obniżonego pH, obecności etanolu czy środków dezynfekcyjnych. Wykazano, że stres cieplny komórek *C. sakazakii* zwiększa ich oporność na podwyższoną kwasowość, warunki liofilizacji i suszenia rozpyłowego [Hsiao i wsp. 2010] oraz środki dezynfekcyjne [Li i wsp. 2013]. Z kolei wstępna ekspozycja na niskie pH powodowała zwiększenie ciepłooporności u *C. sakazakii* [Jang i Bang 2011, Kim i wsp. 2012]. Narazone wstępnie na etanol komórki *C. sakazakii* wykazywały większą oporność na zamrażanie (co ciekawe nie na obniżoną temperaturę 4°C), obróbkę cieplną w temperaturze 51°C i wysoką kwasowość (pH 3,3) [Huang i wsp. 2013].

Kolejną cechą, ułatwiającą bakteriom z rodzaju *Cronobacter* zasiedlanie środowiska produkcyjnego, ale także istotnym ich atrybutem związanym z wirulencją, jest zdolność tworzenia biofilmów, które służą jako ochrona przed czynnikami stresu środowiskowego, ale również przed czynnikami odpowiedzi immunologicznej organizmu gospodarza [Hurrell i wsp. 2009a, Park i Kang, 2014]. W licznych badaniach [Iversen i wsp. 2004, Lehner i wsp. 2005, Singh i wsp. 2016] wykazano zdolność *C. sakazakii* przylegania do powierzchni z materiałów stosowanych w przemyśle spożywczym do kontaktu z żywnością, takich jak silikon, lateks, poliwęglan, stal nierdzewna, szkło i polichlorek winylu, na co istotny wpływ może mieć wytwarzanie przez ten gatunek zewnątrzkomórkowych polisacharydów (egzopolisacharydów, EPS) [Beuchat i wsp. 2009, Singh i wsp. 2016].

Iversen i Forsythe [2003] jako pierwsi postawili hipotezę, że pierwotnym ekosystemem bakterii z rodzaju *Cronobacter* są rośliny. Jest ona oparta na kilku cechach tych drobnoustrojów: wytwarzaniu egzopolisacharydów, wytwarzaniu żółtego pigmentu (karotenoidów) oraz oporności na wysuszenie. Cechy te mogą im umożliwić zasiedlenie środowiska roślinnego, zapewniają ochronę przed rodnikami tlenowymi generowanymi przez światło słoneczne oraz okresami suszy.

Zastosowanie olejków eterycznych lub substancji pochodzenia roślinnego jako dodatków do żywności może być jednym z możliwych sposobów ograniczania rozwoju lub niszczenia *Cronobacter* spp. w różnych produktach spożywczych. Zastosowanie naturalnych olejków eterycznych wpisuje się dobrze w trend „czystej etykiety” i pozwala w pewnym stopniu ograniczyć stosowanie dodatków konserwujących. Dane piśmiennictwa na temat wrażliwości bakterii z rodzaju *Cronobacter* na olejki eteryczne są ograniczone jedynie do kilku prac,

dotyczących głównie bakterii z gatunku *C. sakazakii*. W nielicznych badaniach określono hamujące działanie kilku olejków eterycznych oraz karwakrolu, tymolu, eugenolu i kwasu cynamonowego/aldehydu *trans*-cynamonowego przeciwko *C. sakazakii* i *C. malonicus* [Lee i Jin 2008, Amalaradjou i wsp. 2009, Fraňková i wsp. 2014, Al-Nabulsi i wsp. 2015]. Wiedza na temat potencjalnej wrażliwości innych gatunków z rodzaju *Cronobacter* na olejki eteryczne i substancje czynne pochodzenia roślinnego jest nadal bardzo skąpa.

### 5.1. Cel i zakres badań

**Nadrzędnym celem badań i analizy piśmiennictwa, opisanych w cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe** zgodnie z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm. Dz. U. z 2011 r. nr 204, poz. 1200), **było określenie występowania w żywności, scharakteryzowanie pod względem antybiotykooporności oraz wrażliwości na olejki eteryczne i substancje aktywne wchodzące w skład olejków eterycznych bakterii z rodzaju *Cronobacter*.**

Analiza danych literatury dotyczących występowania bakterii z rodzaju *Cronobacter* w:

- żywności pochodzenia zwierzęcego (preparatach do żywienia niemowląt, mleku w proszku, mleku spożywczym pasteryzowanym, serach różnego typu, jajkach oraz mięsie i produktach mięsnych),
- żywności pochodzenia roślinnego (różnych produktach zbożowych, makaronach, ziołach i przyprawach, sałatach, nasionach i orzechach, warzywach i owocach, kiełkach),
- szerokiej gamie produktów gotowych do spożycia,

posłużyła mi do przygotowania artykułu przeglądowego: **H1. Berthold-Pluta A., Pluta A., Stasiak-Różańska L., Garbowska M. (2018): Members of the *Cronobacter* genus – characteristics and prevalence in food. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych 594, 3–15**, który wchodzi w skład cyklu publikacji stanowiących podstawę postępowania o nadanie tytułu doktora habilitowanego.

Zakres badawczy cyklu publikacji, stanowiących podstawę postępowania o nadanie tytułu doktora habilitowanego, obejmował dwa etapy:

**Etap 1.** dotyczył określenia częstotliwości występowania bakterii z rodzaju *Cronobacter* w żywności pochodzenia zwierzęcego na przykładzie produktów przeznaczonych do żywienia niemowląt i małych dzieci oraz żywności pochodzenia roślinnego, a w tym w produktach o niskiej aktywności wody (zioła i przyprawy) oraz produktach niskoprzetworzonych typu ready-to-eat (sałaty, kiełki oraz niepasteryzowane soki owocowe i owocowo-warzywne).

Dodatkowym celem było określenie podstawowych cech fenotypowych, potencjału genetycznego oraz antybiotykooporności wyizolowanych szczepów *Cronobacter* spp. Wyniki badań przeprowadzonych w ramach etapu 1. opublikowałam w następujących trzech manuskryptach:

**H2.** Stasiak-Róžańska L., Garbowska M., Berthold A., Molska I., Ciepielewska-Janias J. (2010): Jakość mikrobiologiczna preparatów do żywienia niemowląt i małych dzieci ze szczególnym uwzględnieniem *Enterobacteriaceae* i *E. sakazakii*, *Medycyna Weterynaryjna* (66)9, 622-625,

**H3.** Garbowska M., Berthold-Pluta A., Stasiak-Róžańska L. (2015): Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter* spp. *Food Microbiology* 49, 1-5,

**H4.** Berthold-Pluta A., Garbowska M., Stefańska I., Pluta A. (2017): Microbiological quality of selected ready-to-eat leaf vegetables, sprouts and non-pasteurized fresh fruit-vegetable juices including the presence of *Cronobacter* spp. *Food Microbiology* 65, 221-230.

**Etap 2.** obejmował określenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej 18 wybranych olejków eterycznych wobec 21 szczepów z 5 gatunków bakterii z rodzaju *Cronobacter*, a także określenie wrażliwości pięciu szczepów z gatunków *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. muytjensii*, *C. turicensis* oraz *C. condimenti* na substancje aktywne wchodzące w skład olejków eterycznych: tymol, aldehyd cynamonowy, eugenol i mentol, będących odpowiednio głównymi składnikami olejku tymiankowego, cynamonowego, goździkowego oraz olejku z mięty pieprzowej. Materiałem badawczym w tym etapie były szczepy wyizolowane z rynkowych produktów (sałat i kiełków) w ramach doświadczeń Etapu 1., przedstawionych w publikacji H4. Wyniki otrzymane w Etapie 2. omówiłam w publikacji **H5.** Berthold-Pluta A., Stasiak-Róžańska L., Pluta A., Garbowska M. (2018): Antibacterial activities of plant-derived compounds and essential oils against *Cronobacter* strains. *European Food Research and Technology* 245, 1137-1147 (doi: 10.1007/s00217-018-3218-x), która wchodzi w skład cyklu publikacji stanowiących podstawę niniejszego postępowania habilitacyjnego.

## 5.2. Występowanie i charakterystyka bakterii z rodzaju *Cronobacter* w żywności pochodzenia zwierzęcego i roślinnego

Pierwsze dane o zanieczyszczeniu PIF bakteriami z rodzaju *Cronobacter* (wtedy jako *Enterobacter sakazakii*) pochodzą z publikacji **Muytjens i wsp. [1988]**, w której wykazano obecność *Enterobacteriaceae* w 52,2% próbek PIF pochodzących z kilkadziesiąt krajów, z czego 14% próbek zawierało *E. sakazakii* (w 2013 r. szczepy wyizolowane i zakwalifikowane przez **Muytjens i wsp.** jako *E. sakazakii* poddano analizie sekwencji DNA i zidentyfikowano jako *C. sakazakii*, *C. malonaticus* i *C. muytjensii* [**Sonbol i wsp. 2013**]). W latach 90-tych XX w.

i na początku XXI w., na fali odnotowywanych przypadków zakażeń u noworodków, a także niepokojących wyników badań wstępnych [Muytjens i wsp. \[1988\]](#), ukazało się wiele publikacji monitorujących występowanie *Cronobacter* spp. w żywności dla niemowląt i małych dzieci oraz w mleku w proszku [[Iversen i Forsythe 2004](#), [Chap i wsp. 2009](#), [Jaradat i wsp. 2009](#), [Kandhai i wsp. 2010](#)]. Ze względu na brak danych z tego zakresu w piśmiennictwie krajowym, wraz ze współpracownikami podjęliśmy się badań, których celem było określenie występowania bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz z gatunku *Enterobacter sakazakii* (aktualnie z rodzaju *Cronobacter*) w próbkach handlowych preparatów do żywienia niemowląt w wieku od 0 do 4. miesiąca życia, preparatów przeznaczonych dla niemowląt od 4. do 12. miesiąca życia i produktach dla dzieci w wieku od 9-12 miesiąca do 3 lat (**publikacja H2**). W badanych próbkach oznaczono ogólną liczbę drobnoustrojów (OLD), obecność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* (według [PN-ISO 21528-2:2005](#)) oraz obecność *Enterobacter sakazakii* (według [PKN-ISO/TS 22964 \[2008\]](#)).

Stwierdzono, że w żadnej z przebadanych próbek preparatów dla dzieci najmłodszych w wieku do 12. miesiąca życia, OLD nie przekroczyła 3 log jtk/g, natomiast w 11% próbek produktów przeznaczonych dla dzieci w wieku do 3 lat sięgnęła 4-5 log jtk/g. Obecność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* w 10 g produktu wykazano tylko w 4 próbkach (6,7%), z czego w trzech próbkach przeznaczonych dla dzieci najstarszych i jednej - dla niemowląt od 4. do 12. miesiąca życia. W wybranych 30 próbkach preparatów wykonano oznaczenia obecności *E. sakazakii* (obecnie *Cronobacter* spp.). Po wstępnych etapach namnażania, w przypadku dwóch próbek odnotowano wzrost nietypowych zielonych kolonii na pożywce chromogennej, które jednak w temperaturze 25°C na agarze tryptonowo-sojowym nie wytwarzały żółtego pigmentu, a na końcowym etapie - zostały wykluczone na podstawie identyfikacji przy zastosowaniu testów API 20E. Na podstawie otrzymanych wyników wnioskowano, że w przebadanych produktach bakterie z gatunku *E. sakazakii* nie występowały. Na podstawie późniejszych danych piśmiennictwa wykazujących, że około 25% izolatów *Cronobacter* nie wytwarza żółtego pigmentu w warunkach przewidzianych przez pierwszą wersję normy ISO z 2007 r. oraz ze względu na to, że niektóre szczepy *Cronobacter* nie rosną w temperaturze 44°C [[Iversen i Forsythe 2007](#)], w zaktualizowanej metodyce oznaczania *Cronobacter* spp., tj. normie [ISO 22964:2017](#), te cechy identyfikacyjne zostały usunięte, gdyż mogłyby prowadzić do błędnego odrzucania z dalszych etapów identyfikacji izolatów *Cronobacter* spp., co skutkowałoby uzyskiwaniem fałszywie zaniżonych wyników.

Kolejnym, podjętym przeze mnie, kierunkiem badawczym, który wynikał z interpretacji wyników otrzymanych w **publikacji H2** oraz analizy danych piśmiennictwa (**publikacja H1**)

było określenie występowania *Cronobacter* spp. w ziołach i przyprawach, czyli produktach pochodzenia roślinnego (**publikacja H3**). Moje zainteresowanie skierowałam na tego rodzaju produkty, gdyż z danych literatury wynika, że bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*, obok bakterii przetrwalnikujących (głównie z rodzaju *Bacillus*) oraz pleśni, stanowią najliczniejszą mikroflorę przypraw i ziół [Garcia i wsp. 2001, Banerjee i Sarkar 2004, Witkowska i wsp. 2011]. Jednocześnie, zioła i przyprawy są istotnym źródłem zanieczyszczenia mikrobiologicznego wielu produktów i potraw gotowych [Banerjee i Sarkar 2003]. W latach 1973-2010 w Stanach Zjednoczonych, Kanadzie, Wielkiej Brytanii, Francji, Niemczech, Danii i Norwegii spożycie pokarmów, do których dodano zanieczyszczone przyprawy i zioła, spowodowało łącznie 1946 przypadków zatruc pokarmowych, w tym dwa przypadki śmiertelne [Van Doren i wsp. 2013].

Materiałem badawczym w **publikacji H3** było 60 próbek handlowych przypraw i ziół z trzech grup: 1. zioła (liście laurowe (*Laurus nobilis*), tymianek (*Thymus vulgaris*), oregano (*Origanum vulgare*), estragon (*Artemisia dracunculus*), bazylija (*Ocimum basilicum*), majeranek (*Origanum majorana*), koper (*Anethum graveolens*), liście pietruszki (*Petroselinum crispum*), lubczyk (*Levisticum officinale*) i rozmaryn (*Rosmarinus officinalis*); 2. mieszanki przyprawowe (zioła prowansalskie, mieszanka ziół i przypraw do kiszenia ogórków, mieszanka ziół i przypraw do mięsa i ryb) oraz 3. nasiona i owoce przyprawowe (ziele angielskie (*Pimenta dioica*), kolendra (*Coriandrum sativum*) i czarny pieprz (*Piper nigrum*). W próbkach oznaczono OLD i obecność bakterii z rodzaju *Cronobacter*, stosując metodykę PKN-ISO/TS 22964 [2008].

Na podstawie charakterystycznego wzrostu *Cronobacter* spp. na pożywce chromogennej wyizolowano kolonie drobnoustrojów podejrzanych o przynależność do badanej grupy z 16 próbek produktów, po kolejnym etapie na podstawie wytwarzania żółtego pigmentu na pożywce TSA i badaniach biochemicznych (testy API 20E) do rodzaju *Cronobacter* zakwalifikowano tylko 14 izolatów. Potwierdzać to może, że współwystępowanie innych bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* w materiale badawczym zmniejsza selektywność pożywek chromogennych wobec *Cronobacter* spp., co podkreślają inni autorzy [Lehner i wsp. 2006, Iversen i Forsythe 2007]. Procent identyfikacji izolatów *Cronobacter* spp. uzyskanych w moich badaniach wahał się od 98,4 do 99,9%, a jedyną zaobserwowaną różnicą w ich profilu biochemicznym była zdolność fermentacji inozytolu. Podsumowując, w oparciu o przeprowadzone testy biochemiczne, obecność bakterii z rodzaju *Cronobacter* stwierdzono w 10 próbkach produktów (16,7%), w tym w 9 próbkach ziół (bazylii, estragonu, liściach pietruszki), co stanowiło 23,7% próbek z grupy 1. oraz w jednej próbce ziół prowansalskich (6,3% produktów tego typu). Wśród innych uzyskanych izolatów były bakterie z gatunku *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* oraz nieokreślone gatunkowo bakterie z rodzaju *Pantoea* i *Erwinia*. Stosując tę samą metodykę



w badaniach próbek środowiskowych i produktów spożywczych, [Drudy i wsp. \[2006a\]](#) izolując, *Cronobacter* spp. stwierdzili obecność *Pantoea agglomerans* i *Escherichia*, [Iversen i Forsythe \[2007\]](#) - *E. cloacae* i *Pantoea* spp., oraz [Kandhai i wsp. \[2004a\]](#) - *Klebsiella* spp., *Erwinia* spp., *E. cloacae* i *P. agglomerans*, podobnie jak w moich badaniach.

Z danych piśmiennictwa przeanalizowanych w **publikacji H1**, wynika, że roślinne produkty suszone, do których należą przyprawy i zioła charakteryzują się dużą częstotliwością występowania bakterii z rodzaju *Cronobacter* w zakresie od około 3 do 52% [[Restiano i wsp. 2006](#), [Iversen i Forsythe 2007](#), [Baumgartner i wsp. 2009](#), [Jaradat i wsp. 2009](#), [Kandhai i wsp. 2010](#), [Sospedra i wsp. 2010](#), [Turcovský i wsp. 2011](#), [Hochel i wsp. 2012](#), [Li i wsp. 2014](#), [Ogihara i wsp. 2014](#), [Singh i wsp. 2015a](#), [Brandão i wsp. 2017](#)]. Wśród gatunków wyizolowanych z przypraw (pieprzu czarnego, imbiru i kminku) przez [Turcovský i wsp. \[2011\]](#) były izolaty *C. sakazakii* (52% próbek) oraz, w o wiele mniejszym odsetku próbek, *C. malonicus* (4,8% próbek) i *C. muytjensii* (4,8% próbek). [Ogihara i wsp. \[2014\]](#) obecność bakterii *Cronobacter* spp. stwierdzili w 19,0% próbek przypraw i 47,0 % próbek ziół, a wśród wyizolowanych szczepów były *C. sakazakii*, *C. muytjensii*, *C. turicensis* i *C. dublinensis*. Bakterie z rodzaju *Cronobacter* izolowane były także z próbek herbat [[Maćkiw i wsp. 2011](#), [Turcovský i wsp. 2011](#)] oraz suszy przeznaczonych do przyrządzania naparów, np. dla dzieci [[Stojanović i wsp. 2011](#)].

Ponieważ w Unii Europejskiej nie obowiązują żadne regulacje prawne, dotyczące jakości mikrobiologicznej przypraw i ziół, to w handlu międzynarodowym tymi produktami stosuje się zwykle kryteria ujęte przez ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, [ICMSF \[2005\]](#)), według których akceptowalny poziom OLD wynosi  $< 4 \log$  jtk/g, poziom 4 - 6 log jtk/g oznacza jakość dopuszczalną, a poziom  $> 6 \log$  jtk/g - nieakceptowalną. Stosując te wymagania, większość przeanalizowanych próbek przypraw i ziół charakteryzowało się dobrą jakością mikrobiologiczną, w 60,0% próbek OLD nie przekraczała 4 log jtk/g i jednocześnie w żadnej próbce nie stwierdzono zanieczyszczenia przekraczającego poziom 6 log jtk/g. Najsilniejsze zanieczyszczenie (4 - 6 log jtk/g) stwierdzono w próbkach ziół (estragonu, bazylii) i mieszanek przypraw, a najmniejsze - w próbkach kolendry, czarnego pieprzu i ziela angielskiego ( $< 4 \log$  jtk/g). Należy podkreślić, że ogólna liczba drobnoustrojów jest jedynie bardzo ogólnym wskaźnikiem jakości mikrobiologicznej badanych produktów i nie istnieją żadne wymagania prawne, odnoszące się do tego wskaźnika. Przytaczane i proponowane przez ekspertów lub instytucje zajmujące się bezpieczeństwem i jakością produktów spożywczych zalecenia, mogą mieć znaczenie np. w wymianie handlowej.

Kolejnym krokiem w etapie 1. było określenie występowania bakterii z gatunków *Cronobacter* w produktach roślinnych, takich jak kielki, sałaty i niepasteryzowane soki owocowe

i owocowo-warzywne. Moim celem było także zidentyfikowanie genetyczne izolatów na podstawie sekwencjonowania 16S rDNA, analizy PCR-RFLP oraz analizy RAPD-PCR i na tej podstawie przypisanie ich do określonego gatunku z rodzaju *Cronobacter*. Dodatkowo, określono także wrażliwość wyizolowanych szczepów *Cronobacter* spp. na wybrane antybiotyki (**publikacja H4**).

Wszystkie produkty, będące materiałem badawczym, należały do grupy produktów RTE, czyli ready-to-eat, a więc takich, których nie trzeba poddawać żadnej obróbce przed spożyciem. Było to 60 próbek produktów z trzech grup: 1. warzywa liściaste i ich mieszanki (tzw. sałaty), 2. kiełki oraz 3. niepasteryzowane soki owocowe i owocowo-warzywne. Wszystkie sałaty i kiełki oznakowane były przez producentów jako "umyte - gotowe do spożycia". W próbkach badanych produktów oznaczyłam OLD [PN-EN ISO 4833-1:2013-12] oraz obecność *Cronobacter* spp. według PKN-ISO/TS 22964 [2008].

Produkty roślinne typu RTE mogą zostać zanieczyszczone na każdym etapie ich pozyskiwania i przetwarzania, a do potencjalnych źródeł zanieczyszczenia mikrobiologicznego tych produktów zaliczyć można glebę, wodę, odchody, zwierzęta (np. owady i ptaki) i ludzi, urządzenia stosowane w rolnictwie oraz zakładach przemysłu spożywczego, a także wykorzystywane środki transportu [Johannessen i wsp. 2002, Berger i wsp. 2010]. W UE w latach 2009 - 2014 procentowy udział zatruc pokarmowych wywołanych spożyciem zanieczyszczonych warzyw i soków owocowych wzrósł z 2,1 do 7,1% [EFSA 2011, 2015]. Z licznych danych piśmiennictwa [Abadias i wsp. 2008, Berger i wsp. 2010, Koseki i wsp. 2011, Seow i wsp. 2012] jednoznacznie wynika, że świeże produkty pochodzenia roślinnego mogą zawierać drobnoustroje patogenne, np. *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* i *Salmonella*.

Ogólna liczba drobnoustrojów w przebadanych sałatach i mieszankach sałat była w zakresie od 5,6 do 7,6 log jtk/g i był to poziom podobny do danych piśmiennictwa z różnych krajów [Abadias i wsp. 2008, Valentin-Bon i wsp. 2008, Althaus i wsp. 2012, Seow i wsp. 2012, Jeddi i wsp. 2014, Gomez-Govea i wsp. 2012], natomiast wyższy w porównaniu do wyników badań z krajów, w których dozwolone jest stosowanie roztworów związków chloru do utrwalania świeżych warzyw [Bohaychuk i wsp. 2009, Koseki i wsp. 2011]. Jak podaje Ragaert i wsp. [2007], ogólna liczba drobnoustrojów na poziomie 7 - 8 log jtk/g w minimalnie przetworzonych warzywach powoduje widoczne obniżenie jakości tych produktów. W moich badaniach taki poziom OLD stwierdziłam w 40% próbek sałat, chociaż jednocześnie nie zaobserwowałam wizualnie ich żadnych wad. OLD w próbkach kiełków wahała się od 6,7 do 8,4 log jtk/g, a w większości próbek (60%) była w zakresie 7 - 8 log jtk/g. Na tak znaczne zanieczyszczenie tego typu produktów wskazują dane literatury [Abadias i wsp. 2008, Althaus i

wsp. 2012, Jeddi i wsp. 2014]. Warunki produkcji kiełków, a zwłaszcza warunki etapu kiełkowania, czyli względnie wysoka temperatura, znaczna wilgotność oraz dostępność składników odżywczych, sprzyjają rozwojowi bakterii [Ragaert i wsp. 2007, Abadias i wsp. 2008, Jeddi i wsp. 2014]. Przykładowo, zwiększenie OLD w czasie 5-dniowego kiełkowania nasion brokułu sięgało 2 - 3 rzędów wielkości [Martínez-Villaluenga i wsp. 2008]. Warto także podkreślić, że proces produkcji kiełków nie obejmuje żadnego etapu usuwania drobnoustrojów, w tym także patogennych, czy chociażby zmniejszania ich liczebności. Dlatego niezmiernie istotne, w przypadku tych produktów, jest stosowanie przez producentów odpowiednich praktyk produkcyjnych i higienicznych, w celu ograniczenia możliwości zanieczyszczenia mikrobiologicznego produktu. Ostatnią grupą produktów, których jakość mikrobiologiczną opisałam w **publikacji H4**, były soki niepasteryzowane, które podobnie jak kiełki, są produktami, w procesie produkcji których nie ma etapu utrwalenia, a rozwój obecnej w nich mikroflory jedynie ogranicza się poprzez chłodnicze przechowywanie. W większości próbek niepasteryzowanych soków (60%) OLD była w zakresie od >3 do 4 log jtk/g, ale w 20% - sięgała wartości >7 - 8 log jtk/g, co znajduje potwierdzenie w piśmiennictwie z tego zakresu zarówno odnoszącym się do soków otrzymywanych przemysłowo, jak i pochodzących z handlu ulicznego [Rashed i wsp. 2013, Agwa i wsp. 2014, Iqbal i wsp. 2015, Simforian i wsp. 2015].

W przebadanych przeze mnie próbkach sałat, kiełków oraz niepasteryzowanych soków owocowych i owocowo-warzywnych (**publikacja H4**), na podstawie charakterystycznego wzrostu na pożywce chromogennej i wytwarzania żółtego pigmentu na agarze TSA, obecność przypuszczalnych *Cronobacter* spp. stwierdziłam w 21 produktach i kolejnemu etapowi identyfikacji (test API 20E) poddałam 32 izolaty. Procent identyfikacji na podstawie testów biochemicznych wynosił od 97,8 do 99,9%. Różnice w profilu biochemicznym izolatów dotyczyły zdolności fermentacji sorbitolu i inozytolu oraz syntezy indolu (odmiennie niż szczepy wyizolowane z ziół i przypraw - publikacja H3). Wykonana następnie analiza przy użyciu BLASTn sekwencji 16S rDNA, której poddano 21 izolatów (po jednym z każdej próbki) wykazała wysoką homologię (>99%) do rodzaju *Cronobacter* (potwierdziła prawidłowość identyfikacji) wszystkich izolatów. Na podstawie analizy filogenetycznej danych sekwencji (Fig. 1 w publikacji 4) stwierdziłam, że 14 z 21 izolatów wykazuje podobieństwo do szczepów referencyjnych *C. sakazakii* NCTC 8155 i *C. malonicus* LMG 23826 i ich zidentyfikowanie na poziomie gatunkowym na podstawie analizy sekwencji genów 16S rDNA nie jest możliwe. Cztery izolaty (s16, s34, s50 i s51) zidentyfikowano jako *C. muytjensii*, dwa kolejne izolaty (lv53 i lv54) - jako *C. turicensis* i jeden jako *C. condimenti* (szczep s37).



Do odróżnienia 14 szczepów *C. sakazakii*/*C. malonaticus*, niedających się zakwalifikować do gatunku na podstawie analizy sekwencji genów 16S rDNA, wykorzystano metodę PCR-RFLP z zastosowaniem pojedynczego enzymu restrykcyjnego *HinP1I* (GYCGC) i uzyskano 4 różne grupy RFLP. Do grupy A i gatunku *C. sakazakii* zaklasyfikowano pięć szczepów: s12, s14, lv25, lv27 i lv28; do grupy B - dwa szczepy: s41 i s42 o wzorze RFLP podobnym do szczepu referencyjnego *C. sakazakii* NTCT 8155, przy czym zamiast fragmentu o wielkości 186 pz zaobserwowano fragment o wielkości 158 pz (sekwencjonowanie genu *rpoB* obu szczepów wykazało mutację A → G w pozycji 159, licząc od początku sekwencji analizowanego fragmentu, co spowodowało powstanie dodatkowego miejsca rozpoznania dla endonukleazy restrykcyjnej *HinP1I* i w efekcie podzielenie fragmentu 186 pz na dwa fragmenty o wielkości 158 i 28 pz, przy czym ten mniejszy był niewykrywalny w elektroforezie w żelu agarozowym); do grupy C i gatunku *C. sakazakii* - zaliczono sześć szczepów: s21, s22, s44, s45, s47 i s48, natomiast do grupy D i gatunku *C. malonaticus* zakwalifikowano szczep lv31.

Następnie, wszystkie izolaty *Cronobacter* spp. poddałam zróżnicowaniu genetycznemu metodą RAPD-PCR z wykorzystaniem trzech różnych 10-nukleotydowych starterów, z których dwa, UBC282 i UBC245, stosowano wcześniej w badaniach nad tymi drobnoustrojami [Nazarowec-White i Farber 1999, Kim i wsp. 2008, 2011]. W RAPD-PCR z użyciem startera UBC282 wyróżniłam 11 wzorów RAPD, z użyciem startera RP - 12 wzorów, a z użyciem startera UBC245 - 15 różnych wzorów RAPD. Na tej podstawie, w obrębie badanych szczepów wyróżniłam 13 genotypów (I-XIII). Izolaty zidentyfikowane jako *C. condimenti* i *C. malonaticus* miały unikatowy wzór RAPD. W obrębie izolatów *C. mytjensii* każdy izolat miał inny wzór RAPD, a więc inny genotyp. W przypadku izolatów *C. turicensis* i większości izolatów *C. sakazakii* zaobserwowałam identyczne wzory RAPD lub wzory różniące się co najwyżej jednym fragmentem. Tak niewielkie zmiany, a także podobne źródło izolacji (próbki różnych produktów, ale pochodzących od tego samego producenta) mogą sugerować pochodzenie klonalne izolatów.

Podsumowując, na podstawie fenotypu oraz analizy genotypowej wyizolowanych szczepów, obecność *Cronobacter* spp. potwierdziłam w 35% badanych próbek, w tym 30% próbek sałat (rukoli, roszponki, endywii i mieszankach sałat) i 75% próbek kiełków (lucerny, brokuła, soczewicy, rzodkiewki, słonecznika, pora i mieszanki kiełków) i są to dane znajdujące potwierdzenie w literaturze. Z analizy danych piśmiennictwa [Baumgartner i wsp. 2009, Kim i wsp. 2011, Althaus i wsp. 2012, Hochel i wsp. 2012, Vojkowska i wsp. 2016] (publikacja H1), wynika, że bakterie z rodzaju *Cronobacter* spp. stanowią mikroflorę warzyw i innych produktów roślinnych, np. kiełków. Z badań przeprowadzonych w Czechach, odsetek próbek różnych warzyw, w których stwierdzono obecność *Cronobacter* spp. wynosił od około 1 do 13%, warzyw

mrożonych - około 33%, a kiełków - 40% [Vojkovska i wsp. 2016]. W innych krajach, odsetek próbek warzyw, w których wykazano obecność bakterii z rodzaju *Cronobacter* wahał się od około 4 do 42% [Jung i Park 2006, Turcovský i wsp. 2011, Lee i wsp. 2012, Singh i wsp. 2015a]. Kim i wsp. [2011] obecność *Cronobacter* spp. stwierdzili aż w 70% próbek warzyw korzennych i tylko w około 5% próbek gleby z farmy, z której pochodziły. W moich badaniach większość wyizolowanych szczepów (61,9%, 13 szczepów), należała do gatunku *C. sakazakii*, a pozostałe szczepy to *C. muytjensii* (19,0%, 4 szczepy), *C. turicensis* (9,5%, 2 szczepy) oraz pojedyncze szczepy *C. malonaticus* i *C. condimenti*. Taka przewaga występowania gatunku *C. sakazakii* stwierdzona była też w badaniach Lehner [2010], Müller i wsp. [2013] i Xu i wsp. [2015].

Z badań dotyczących wrażliwości izolatów *Cronobacter* na wybrane antybiotyki, przeprowadzonych standardową metodą krążkową na agarze Mueller-Hinton według CLSI [2015] wynika, że wszystkie badane izolaty z gatunku *C. sakazakii*, *C. muytjensii*, *C. turicensis* i *C. malonaticus* były wrażliwe na ampicylinę, cefepim, chloramfenikol, gentamycynę, streptomycynę, tetracyklinę, ciprofloksacynę i kotrimoksazol. Jedynie szczep *C. condimenti* s37 wykazywał średnią oporność wobec streptomycyny i kotrimoksazolu. Osiem wyizolowanych szczepów było średnio wrażliwych na cefotaxim. Żaden ze szczepów nie okazał się odporny na którykolwiek z badanych antybiotyków. Podobną wrażliwość szczepów *Cronobacter* spp., wyizolowanych z preparatów do żywienia niemowląt, wykazał Terragno i wsp. [2009] i Xu i wsp. [2015]. Bakterie z rodzaju *Cronobacter* są wrażliwe na antybiotyki z grup: tetracyklin, aminoglikozydów,  $\beta$ -laktamów, chinolonów i chloramfenikol [Lee i wsp. 2012], a infekcje wywołane przez te patogeny leczy się, stosując łącznie ampicylinę i gentamycynę lub ampicylinę i chloramfenikol [Lai 2001]. W literaturze są jednak informacje o oporności *Cronobacter* na ampicylinę [Li i wsp. 2014] i chloramfenikol [Lee i wsp. 2012]. Antybiotykooporność niektórych szczepów *Cronobacter* spp. tłumaczy się syntezą  $\beta$ -laktamaz i posiadaniem wielu operonów oporności na antybiotyki [Girlich i wsp. 2001].

Ponieważ w trakcie badań przedstawionych w **publikacji H4** wyizolowałam szczep *C. condimenti* s37, który jest drugim na świecie wyizolowanym szczepem z tego gatunku (pierwszy szczep *C. condimenti* LMG26250T wyizolowali i opisali Joseph i wsp. 2012), po nawiązaniu współpracy z prof. Stephenem Forsythe'm oraz dr Pauline Ogrodzki ze School of Science and Technology, Nottingham Trent University w Wielkiej Brytanii, zdecydowałam o konieczności pełniejszej analizy genomu tych drobnoustrojów. Analiza MLST (z ang. multi-locus sequence typing) i sekwencjonowanie całego genomu jest najlepszą i zalecaną metodą genetyczną charakteryzowania szczepów z rodzaju *Cronobacter* [Forsythe i wsp. 2014].

Uzyskany genom szczepu *Cronobacter condimenti* s37, wyizolowanego z kiełków rzodkiewki, został zdeponowany w DDBJ/ENA/GenBank pod numerem RQE001000001-RQE001000043, BioProject: PRJNA506216 oraz w bazie dedykowanej dla *Cronobacter* PubMLST po numerem ID 1896. Genom szczepu *C. condimenti* s37 został adnotowany z zastosowaniem serwera Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) [Aziz i wsp. 2008]. Składanie i adnotacja genomu wykazała genom o wielkości 4 590 991 pz, zawierający 4476 sekwencji kodujących, 86 RNAs i zawartości G+C na poziomie 55,7%. Wykryte sekwencje kodujące obejmowały geny oporności na metale ciężkie (kobalt, cynk i kadm), homeostazy miedzi i potasu, reakcji na stres osmotyczny i oksydacyjny, geny powiązane z odpowiedzią na fagi oraz oporności na antybiotyk fosfomicynę (gen *fos*). Obecność genu oporności na fosfomicynę wśród izolatów *C. sakazakii* stwierdzili także Jang i wsp. [2018].

Wśród genów determinujących kodowanie czynników wirulencji zidentyfikowałam gen hemolizyny III, wykazany także w genomie szczepów z różnych gatunków z rodzaju *Cronobacter* przez Joseph i wsp. [2012a]. Z kolei nie zidentyfikowałam sekwencji kodującej geny wykorzystania kwasu sialowego, co wiąże się z wirulencją u *C. sakazakii* [Joseph i wsp. 2012a]. W genomie szczepu *C. condimenti* s37 zidentyfikowałam geny *ompA*, *ompC*, *ompL* i *ompW*, kodujące białka porynowe. Białka porynowe (poryny) u bakterii Gram(-) zaangażowane są w interakcje z komórkami i układem odpornościowym gospodarza, dlatego uważa się je za czynniki wirulencji [Kędziora i wsp. 2016]. Przypuszcza się, że białka błony zewnętrznej ściany komórkowej *ompA* i *ompX* odgrywają rolę przy penetrowaniu bariery krew-mózg przez *C. sakazakii* [Kim i wsp. 2010, Forsythe i wsp. 2014]. W genomie szczepu s37 zidentyfikowałam również geny kodujące dwukomponentowy system regulacyjny kodowany przez geny *envZ* i *ompR*, prawdopodobnie zaangażowany w regulację ekspresji genów kodujących poryny.

W genomie szczepu s37 stwierdziłam także obecność genów systemu sekrecyjnego typu VI (T6SS). System ten wiązany jest z cytotoksycznością, inwazją do komórek gospodarza i umożliwianiem wzrostu patogenów w makrofagach [Joseph i wsp. 2012a, Zhou i wsp. 2012]. Geny kodujące identyczne systemy sekrecji stwierdzili u *Cronobacter* spp. Kucerova i wsp. [2010] oraz Joseph i wsp. [2012a].

Ponieważ żelazo jest dla bakterii istotnym czynnikiem wzrostu, posiadają one różne mechanizmy jego pozyskiwania ze środowiska, m.in. wydzielają poza komórkę siderofory, czyli związki chelatujące żelazo (np. enterobaktynę). W genomie szczepu s37 zidentyfikowałam geny kodujące enterobaktynę (*entABCDFS*) oraz dodatkowo siderofory innego typu (*fhuABCDE*). Podobne wyniki dla większości przebadanych szczepów *Cronobacter* otrzymali Joseph i wsp. [2012a].

W genomie *C. condimenti* s37 wykryłam również geny, wskazujące na zdolność rozkładu ksylozy (*xylA*), podobnie jak Jang i wsp. [2018], Chase i wsp. [2017], u szczepów *C. sakazakii* oraz Joseph i wsp. [2012a] u *C. condimenti* LMG26250T. Może to potwierdzać hipotezę, że naturalną niszą dla bakterii z rodzaju *Cronobacter* jest środowisko roślinne, jak zakładali Schmid i wsp. [2009].

Jednym z mechanizmów oporności wielolekowej u bakterii jest system usuwania leków z komórki (tzw. pompy efflux). U szczepu s37 stwierdziłam obecność operonu *acrAB*, kodującego białka odpowiedzialne za tego typu system [Chase i wsp. 2017, Jang i wsp. 2018]. Geny wchodzące w skład operonu *acrAB* w genomie szczepów *C. sakazakii*, wyizolowanych z roślinnych produktów spożywczych, wykazali także Jang i wsp. [2018] oraz Chase i wsp. [2017] - u szczepu *C. sakazakii* GP1999 wyizolowanego z systemu korzeniowego pomidora zwyczajnego.

Zdolność tworzenia biofilmów na powierzchniach abiotycznych, a także zwiększoną oporność na czynniki zewnętrzne (ciepło, wysuszenie, pH) wiąże się u bakterii z rodzaju *Cronobacter*, podobnie jak u wielu innych bakterii, z wytwarzaniem egzopolisacharydów (EPS) [Berthold-Pluta 2007 (IID13), Beuchat i wsp. 2009, Singh i wsp. 2015]. Jednym ze składników EPS u *Cronobacter* spp. jest kwas kolonowy [Singh i wsp. 2015], za którego biosyntezę odpowiedzialne są geny operonu *wca*, którego obecność zidentyfikowałam w genomie szczepu *C. condimenti* s37.

Dane piśmiennictwa przedstawione w **publikacji H1** odnośnie obecności *Cronobacter* spp. w produktach roślinnych o niskiej zawartości wody są nieliczne. Freire i Offord [2002] stwierdzili obecność bakterii *Cronobacter* spp. w orzechach nerkowca i brazylijskich, z kolei Turcovsky i wsp. [2011] - w orzechach laskowych i arachidowych. Hochel i wsp. [2012] obecność tych bakterii stwierdzili w 41,2% próbek nasion. Suszone owoce i orzechy, według FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization), zaliczane są do kategorii żywności o niskiej zawartości wody (z ang. low moisture foods, LMF), czyli takiej, która naturalnie lub dzięki zastosowaniu suszenia lub odwadniania charakteryzuje się niską aktywnością wody ( $a_w$ ), w wyniku czego jest trwała [FAO/WHO 2014]. Tymczasem, jak opisałam w **publikacji H1**, najniższa  $a_w$ , przy której bakterie z rodzaju *Cronobacter* wykazywały przeżywalność wynosiła 0,25 [Barron i Forsythe 2007, Beuchat i wsp. 2009]. Dlatego postanowiłam określić występowanie bakterii z rodzaju *Cronobacter* w orzechach, nasionach, suszonych lub kandyzowanych owocach oraz mieszankach orzechów, nasion i suszonych owoców ("mieszanki"). Publikacja przygotowana na podstawie wyników tych badań jest

na etapie recenzji w czasopiśmie *Journal of Food Safety*. W 64 próbkach tych produktów określiłam obecność bakterii z rodzaju *Cronobacter* spp., stosując podobną metodykę, jak w publikacji H4. Na podstawie tworzenia charakterystycznie zabarwionych kolonii na pożywce chromogennej i żółtego pigmentu na agarze tryptonowo-sojowym do etapu testów biochemicznych (API 20E) zaklasyfikowano 12 izolatów pochodzących z 12 próbek orzechów i mieszanek. Wszystkie izolaty, na podstawie wyników testu API 20E, uznano wstępnie za *Cronobacter* spp. (procent identyfikowalności w zależności od izolatu wynosił od 98,0 do 99,9%). Przeciwnie do wyników przedstawionych w publikacjach H3 i H4, wszystkie izolaty pochodzące z orzechów i mieszanek miały podobny profil biochemiczny pod względem fermentacji inozytolu oraz braku zdolności syntezy indolu. Jedyna różnica dotyczyła dekarboksylacji ornityny. Na podstawie identyfikacji gatunkowej szczepów z wykorzystaniem metody PCR-RFLP polegającej na trawieniu dwoma enzymami restrykcyjnymi (*HinP1I* i *Csp6I*) zamplifikowanego fragmentu genu *rpoB* o wielkości 659-pz, trzy izolaty zidentyfikowano jako gatunek *C. sakazakii*, cztery izolaty - jako *C. turicensis* a pięć - jako *C. malonaticus*. Do wewnątrzgatunkowego różnicowania badanych izolatów użyto RAPD-PCR z trzema różnymi starterami (UBC245, UBC2820 i RP). W obrębie 12 szczepów wyizolowanych z orzechów i mieszanek było mniejsze zróżnicowanie genetyczne (szczepy należały do 6 odmiennych profili) niż w przypadku 21 szczepów wyizolowanych z sałat i kiełków, wśród których wykazano 13 odmiennych profili genetycznych (publikacja H4). Podsumowując, obecność bakterii *C. sakazakii*, stwierdziłam w 10,0% próbek orzechów (orzechy brazylijskie) i 12,5% mieszanek, *C. turicensis* - w 20,0% próbek orzechów (orzechy laskowe i migdały) i *C. malonaticus* - w 20,0% orzechów (orzechy laskowe, nerkowca, macadamia i pini) oraz 12,5% mieszanek. Otrzymane przeze mnie wyniki odnośnie braku obecności *Cronobacter* spp. w nasionach są odmienne od danych opublikowanych przez [Hochel i wsp. \[2012\]](#), którzy z nasion wyizolowali *C. sakazakii*, *C. turicensis* i *C. malonaticus*.

### **5.3. Wrażliwość bakterii z rodzaju *Cronobacter* na olejki eteryczne i substancje pochodzenia roślinnego**

Historia zastosowania naturalnych czynników przeciwdrobnoustrojowych, pozyskiwanych z różnych części roślin, np. olejków eterycznych (EO) w celu utrwalenia żywności, ale także nadania jej pożądanych cech sensorycznych, sięga tysięcy lat wstecz. Olejki eteryczne jako dodatki do żywności mogą spełniać funkcję substancji konserwujących lub tylko wzmacniać działanie zastosowanych konserwantów, dzięki czemu stosowane dawki tych ostatnich mogą być mniejsze. Poziom dodatku EO do żywności, poza osiągnięciem zamierzonego



celu technologicznego, jest limitowany zmianami sensorycznymi, które są związane z ich obecnością w produkcie [Jayasena i Cheorun 2013, Ribeiro-Santos i wsp. 2017].

Aktywność przeciwbakteryjna różnych olejków eterycznych oraz czystych substancji wchodzących w ich skład, wobec patogenów: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus* i *Staphylococcus aureus* była tematem wielu publikacji [Fisher i Phillips 2006, Tajkarimi i wsp. 2010, Mattson i wsp. 2011, Ojeda-Sana i wsp. 2013, Thippeswamy i wsp. 2013, Kim i Rhee 2016]. Wiedza na ten temat w odniesieniu do bakterii z rodzaju *Cronobacter* jest ograniczona jedynie do kilku prac badawczych, dotyczących głównie *C. sakazakii* [Lee i Jin 2008, Amalaradjou i wsp. 2009, Fraňková i wsp. 2014, Al-Nabulsi i wsp. 2015]. Wiedza na temat ewentualnej wrażliwości innych gatunków *Cronobacter* spp. na olejki eteryczne i substancje aktywne pochodzenia roślinnego jest jeszcze bardziej uboga.

Ogólnie, EO wykazują silniejsze działanie hamujące wobec bakterii Gram(+) niż bakterii Gram(-), co tłumaczy się tym, że budowa ściany komórkowej bakterii Gram(-), złożonej z lipopolisacharydów, stanowi barierę dla hydrofobowych składników EO [Burt 2004].

W 2. etapie badań podjęłam się określenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej wybranych osiemnastu roślinnych EO wobec szczepów z pięciu gatunków bakterii z rodzaju *Cronobacter* (13 szczepów *C. sakazakii*, 4 szczepy *C. muytjensii*, 2 szczepy *C. turicensis*, 1 szczep *C. condimenti* i 1 szczep *C. malonaticus*), a także określenie wrażliwości pięciu wybranych szczepów z różnych gatunków *Cronobacter* na substancje aktywne wchodzące w skład EO: tymolu, aldehydu cynamonowego, eugenolu i mentolu, będące głównymi składnikami odpowiednio olejku tymiankowego, cynamonowego, goździkowego oraz olejku z mięty pieprzowej (**publikacja H5**). Wszystkie badane szczepy wyizolowałam w trakcie badań, które przedstawiłam w publikacji H4. W badaniach wykorzystałam następujące olejki eteryczne: tymiankowy (*Thymus vulgaris*), cynamonowy (*Cinnamomum aromaticum*), goździkowy (*Syzygium aromaticum*), mięty pieprzowej (*Mentha piperita*), majerankowy (*Origanum marjorana*), kminkowy (*Carum carvi*), rozmarynowy (*Rosmarinus officinalis*), kopru włoskiego (*Foeniculum vulgare*), bazyliowy (*Ocimum basilicum*), limetkowy (*Citrus aurantifolia*), bergamotkowy (*Citrus aurantium* subsp. bergamia), pomarańczowy (*Citrus sinensis*), cytrynowy (*Citrus limon*), grapefruitowy (*Citrus paradisi*), mandarynkowy (*Citrus reticulate* var. *madurensis*), kardamonowy (*Elettaria cardamomum*), anyżkowy (*Pimpinella anisum*) i imbirowy (*Zingiber officinale*). Do oceny wrażliwości szczepów na EO zastosowałam metodę krążkową (10 µL/krążek bibułowy o średnicy 6 mm) opisaną przez Rusenova i Parvanov [2009], wprowadzając nieznaczne zmiany. Ocenę wrażliwości wybranych pięciu szczepów (*C. sakazakii* lv27, *C. malonaticus* lv31, *C. muytjensii* s50, *C. turicensis* lv53 i *C. condimenti* s37) wobec tymolu,

aldehydu cynamonowego, eugenolu i mentolu przeprowadziłam, stosując nieznacznie zmienioną metodykę według Oussalah i wsp. [2007], wyznaczając MIC (stężenie badanej substancji aktywnej, przy którym nie był widoczny wzrost badanego szczepu) oraz MTC (maksymalne stężenie tolerowane - stężenie badanej substancji aktywnej, przy którym liczba kolonii szczepu nie różniła się jeszcze istotnie od liczby kolonii wyrosłych na płycie z pożywką bez dodatku badanej substancji aktywnej).

Największe strefy zahamowania wzrostu szczepów bakterii z rodzaju *Cronobacter* spp. zaobserwowałam w przypadku olejku tymiankowego (od 15,8 do 31,8 mm). Olejek ten okazał się silnie hamujący (strefa zahamowania wzrostu > 20 mm) dla 13 szczepów, a najbardziej wrażliwe okazały się szczepy *Cronobacter muytjensii*. Bardziej odporne na działanie olejku tymiankowego były szczepy z gatunków *C. turicensis*, *C. malonaticus* i *C. condimenti* (strefa zahamowania wzrostu wynosiła średnio około 17 mm). Strefy zahamowania wzrostu *Enterobacter cloacae* i *E. coli* pod wpływem olejku tymiankowego, wynoszące 22 mm, stwierdzili Soković i wsp. [2010]. Do głównych składników olejku tymiankowego, o których działaniu wiadomo też najwięcej, są tymol i karwakrol [Soković i wsp. 2010, Santurio i wsp. 2014]. Mechanizm działania każdego z tych związków polega na rozrywaniu błony cytoplazmatycznej komórki, co zwiększa jej przepuszczalność i wpływa negatywnie na jej potencjał [Xu i wsp. 2008]. Badane szczepy wykazywały tolerancję na tymol w zakresie stężeń od 0,013 do 0,025% (MTC), natomiast MIC tymolu dla wszystkich szczepów wynosiło 0,05%. Lee i Jin [2008] wykazali hamujące działanie tymolu wobec szczepów *Cronobacter* spp. (MIC 0,019%). Podobną aktywność inhibitującą tymolu w stosunku do *C. sakazakii* oraz *C. malonaticus* odnotowali Fraňková i wsp. [2014] (MIC 0,02%). W literaturze dostępne są podobne wyniki badań, potwierdzające przeciwdrobnoustrojową aktywność tymolu wobec innych gatunków bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* [Olasupo i wsp. 2003, Pei i wsp. 2009].

Znaczną wrażliwość na olejek cynamonowy stwierdziłam tylko u trzech szczepów: *C. muytjensii* s51, *C. sakazakii* s41 i *C. turicensis* lv54, a wobec wszystkich pozostałych szczepów olejek ten wykazywał umiarkowaną aktywność (strefy zahamowania < 20 - 12 mm). Silne właściwości hamujące olejku cynamonowego wobec *C. sakazakii* stwierdzili Al-Nabulsi i wsp. [2015]. Dane piśmiennictwa, dotyczące aktywności tego olejku wobec innych patogenów, np. *L. monocytogenes*, również potwierdzają jego silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe [Oussalah i wsp. 2007, Rusenova i Parvanov 2009]. Głównym składnikiem olejku cynamonowego jest m.in. aldehyd *trans*-cynamonowy w przypadku, którego stwierdziłam porównywalną z tymolem aktywność przeciwdrobnoustrojową. Wartość MTC i MIC dla aldehydu *trans*-cynamonowego wynosiła od odpowiednio 0,025 i 0,05% (szczepy *C. sakazakii* lv27,

*C. malonaticus* lv31 i *C. muytjensii* s50) do odpowiednio 0,05 i 0,1% (szczerpy *C. turicensis* lv53 i *C. condimenti* s37). Otrzymany zakres jest nieco wyższy od stężeń hamujących wzrost bakterii *C. malonaticus* oraz *C. sakazakii*, które wyznaczyli Fraňková i wsp. [2014] (MIC 0,025 i 0,03%, odpowiednio). Aktywność przeciwdrobnoustrojowa aldehydu cynamonowego (lub *trans*-cynamonowego) była częstym obiektem badań, a zakresy MIC wynosiły od 0,015 do 0,04%, w zależności od gatunku bakterii [Rusenova i Parvanov 2009, Hill i wsp. 2013, Ye i wsp. 2013].

Mechanizm przeciwdrobnoustrojowego działania aldehydu *trans*-cynamonowego polega między innymi na ograniczeniu F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPazy, co hamuje syntezę ATP między innymi u *C. sakazakii*. Kompleks F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPazy jest pompą translokującą protony, która może usuwać je z cytoplazmy i wspomagać regulację pH cytoplazmy [Amalaradjou i Venkitanarayanan 2011b]. Do innych mechanizmów działania aldehydu *trans*-cynamonowego zaliczyć można uszkodzenie błony komórkowej i zmiany jej profilu lipidowego [Vasconcelos i wsp. 2018], hamowanie procesów zachodzących w czasie podziału komórki [Domadia i wsp. 2007], zmniejszanie ekspresji genów poryn błonowych (OmpA, OmpC i OmpR) i innych czynników, biorących udział w transporcie aktywnym przez błonę komórkową [Amalaradjou i Venkitanarayanan 2011a, 2011b]. Aldehyd cynamonowy zmniejsza oporność *C. sakazakii* na stres osmotyczny i wysuszenie oraz ogranicza ruchliwość i zdolność tworzenia biofilmu [Amalaradjou i Venkitanarayanan 2011a, 2011b].

Olejek goździkowy okazał się nieskuteczny (strefa zahamowania wzrostu < 12 mm) do zahamowania wzrostu 9 spośród 21 badanych szczepów. Średnica stref zahamowania wzrostu u pozostałych szczepów wahała się od około 12 do 17 mm, przy czym średnie strefy zahamowania wzrostu szczepów *C. sakazakii*, *C. condimenti*, *C. muytjensii* i *C. malonaticus* wynosiły około 12 mm, natomiast szczepów *C. turicensis* - 16 mm. Dane dotyczące właściwości przeciwdrobnoustrojowych olejku goździkowego wobec *Cronobacter* spp. są ograniczone jedynie do informacji o MIC olejku goździkowego dla *C. sakazakii* i *C. malonaticus*, który wynosił 0,05% [Fraňková i wsp. 2014]. Jak podaje Singh i wsp. [2016] ekstrakt goździkowy hamował tworzenie biofilmów przez *C. sakazakii*. Podstawowym składnikiem olejku goździkowego jest eugenol [Hu i wsp. 2018], którego aktywność przeciwdrobnoustrojowa polega na rozrywaniu błony cytoplazmatycznej komórki, co zwiększa jej niespecyficzną przepuszczalność i prowadzi do wycieku jonów i utraty składników komórkowych, co ostatecznie kończy się śmiercią komórki [Devi i wsp. 2010]. Dane dotyczące aktywności eugenolu wobec różnych patogenów są liczne [Olasupo i wsp. 2003, Filgueiras i Vanetti 2006, Pei i wsp. 2009, Hill i wsp. 2013]. W moich badaniach szczepy *Cronobacter* tolerowały obecność eugenolu na poziomie od 0,05 do 0,1% (MTC), a najmniejszą wrażliwością charakteryzował się szczep *C. condimenti* s37. Wartości MIC



dla eugenolu mieściły się w przedziale od 0,1 do 0,2%, podobnie jak w badaniach Lee i Jin [2008] oraz Fraňková i wsp. [2014].

Żaden z przebadanych przeze mnie szczepów *Cronobacter* nie był wrażliwy na olejek z mięty pieprzowej. Na umiarkowane właściwości przeciwdrobnoustrojowe olejku z mięty pieprzowej wskazują dane piśmiennictwa zarówno w odniesieniu do bakterii Gram(+), np. *L. monocytogenes*, *B. licheniformis*, *S. aureus*, jak i Gram(-), np. *E. coli* i *Pseudomonas* spp. [Eteghad i wsp. 2009, Rusenova i Parvanov 2009, Soković i wsp. 2010, Jeyakumar i wsp. 2011, Tyagi i Malik 2011]. Na podstawie obrazowania za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego stwierdzono znaczące zmiany morfologiczne komórek (skurczenie, zdeformowanie i pękanie) w wyniku działania olejku z mięty pieprzowej na *B. subtilis* [Tyagi i Malik 2011]. Jednym z głównych składników olejku eterycznego z *Mentha piperita* jest mentol, a wśród pozostałych są: iso-menton, limonen,  $\beta$ -pinen, octan mentylu, iso-mentanol i mentofuran [Soković i wsp. 2010, Tyagi i Malik 2011]. W moich badaniach mentol charakteryzował się najniższym działaniem przeciwdrobnoustrojowym wobec szczepów *Cronobacter* w porównaniu do pozostałych trzech przebadanych przeze mnie czystych składników EO. MIC mentolu dla czterech spośród badanych szczepów wynosiło 0,8%, a tylko szczep *C. turicensis* lv53 wykazał większą wrażliwość (MIC = 0,4%). Z kolei, wartość maksymalnego stężenia mentolu tolerowanego przez badane szczepy mieściła się w przedziale od 0,2 do 0,4% (MTC). Nie znaleziono w piśmiennictwie wyników badań z zakresu przeciwdrobnoustrojowych właściwości mentolu oraz olejku z mięty pieprzowej wobec *Cronobacter* spp. Nieco mniejsze wartości MIC dla mentolu niż otrzymane przeze mnie podali Trombetta i wsp. [2005] dla *E. coli* (MIC = 0,25%) i jeszcze niższe, ale dla olejku z mięty pieprzowej (MIC  $\approx$  0,1%) - Tyagi i Malik [2011].

Zdecydowana większość badanych szczepów wykazywała umiarkowaną wrażliwość na olejek majerankowy (średnice zahamowania wzrostu wynosiły około 12-18 mm), tylko oba badane szczepy *C. turicensis* - lv53 i lv54 okazały się bardziej wrażliwe (strefy zahamowania 18-22 mm). Aktywność przeciwdrobnoustrojową olejku majerankowego wykazano wobec bakterii Gram(-) (*E. coli*), jak i Gram(+) (*B. cereus*, *B. licheniformis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis*) [Rusenova i Parvanov 2009, Tserennadmid i wsp. 2010].

Umiarkowaną wrażliwością na olejek kminkowy wykazały się tylko cztery szczepy (*C. sakazakii* s44, *C. sakazakii* s22, *C. sakazakii* lv27 i *C. malonaticus* lv31), a pozostałe szczepy były niewrażliwe na olejek kminkowy. Działanie przeciwbakteryjne olejku eterycznego z *Carum carvi* przypisuje się obecności w nim związków polifenolowych [Thippeswamy i wsp. 2013]. Fraňková i wsp. [2014] wykazali umiarkowane działanie przeciwbakteryjne głównych składników olejku kminkowego tj.  $\gamma$ -terpinenu i *p*-cymenu, przeciwko *C. sakazakii* i *C. malonaticus*.

Wszystkie badane szczepy z rodzaju *Cronobacter* były niewrażliwe (strefa zahamowania wzrostu < 12 mm) na olejki: rozmarynowy, bazyliowy, kardamonowy, anyżowy i imbirowy oraz wszystkie olejki z roślin cytrusowych (limetkowy, bergamotkowy, pomarańczowy, cytrynowy, grapefruitowy i mandarynkowy). Dane piśmiennictwa z zakresu aktywności przeciwdrobnoustrojowej tych EO lub ich składników wobec bakterii z rodzaju *Cronobacter* są skąpe. Al-Nabulsi i wsp. [2015] wykazali brak aktywności olejku anyżowego i rozmarynowego przeciwko szczepom *C. sakazakii*. Fraňková i wsp. [2014] wyznaczyli MIC dla substancji wchodzących w skład różnych olejków cytrusowych wobec *C. sakazakii* i *C. malonaticus*: limonenu na poziomie 0,3% i  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinenu - > 0,5%. Z kolei Shi i wsp. [2016] wykazali, że inny składnik olejków cytrusowych - cytral, hamował wzrost *C. sakazakii*.

#### 5.4. Podsumowanie najważniejszych wyników będących przedmiotem osiągnięcia naukowego

W ramach mojego głównego osiągnięcia naukowego wykazałam, że bakterie z rodzaju *Cronobacter* nie występowały w rynkowych preparatach do żywienia niemowląt oraz małych dzieci, choć w 6,7% próbek tych produktów stwierdzono obecność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. W badaniach dotyczących jakości mikrobiologicznej produktów roślinnych o bardzo niskiej aktywności wody obecność *Cronobacter* spp. stwierdziłam w 16,7% próbek ziół oraz mieszanek ziołowych. Natomiast z produktów roślinnych typu ready-to-eat bakterie z rodzaju *Cronobacter* wyizolowałam z 35% badanych próbek, w tym 30% próbek sałat i 75% próbek kiełków. Większość wyizolowanych szczepów należała do gatunku *C. sakazakii* (ok. 62%), 19% stanowiły szczepy *C. muytjensii*, 9,5% - *C. turicensis* oraz pojedyncze szczepy - *C. malonaticus* i *C. condimenti*. Wśród wyizolowanych przeze mnie szczepów były trzy gatunki uznane za chorobotwórcze tj.: *C. sakazakii*, *C. malonaticus* i *C. turicensis*, co wskazuje, że produkty roślinne mogą być nośnikiem tych patogenów.

Stwierdziłam, że żaden z wyizolowanych z produktów roślinnych szczepów z gatunków *C. sakazakii*, *C. muytjensii*, *C. turicensis* i *C. malonaticus* nie był oporny na antybiotyki stosowane do leczenia infekcji wywołanych przez te patogeny, czyli ampicylinę, gentamycynę i chloramfenikol. Wykazałam, że wszystkie szczepy były wrażliwe na cefepim, streptomycynę, tetracyklinę, ciprofloksacynę i kotrimoksazol.

Z wykonanej przeze mnie analizy danych piśmiennictwa dotyczącego występowania bakterii z rodzaju *Cronobacter* w różnego rodzaju produktach żywnościowych wynika, że bakterie z rodzaju *Cronobacter* rzadko były izolowane z produktów żywnościowych, które powszechnie kojarzy się jako nośniki różnych patogenów, np. jajek, mięsa, czy mleka, natomiast

występowały w przetworzonych i nieprzetworzonych produktach pochodzenia roślinnego, co potwierdziłam w swoich badaniach.

Moje badania, dotyczące aktywności przeciwbakteryjnej wybranych olejków eterycznych oraz substancji aktywnych będących ich składnikami wobec bakterii należących do gatunków *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii* oraz *C. condimenti*, są najprawdopodobniej jedynymi tak szeroko opisującymi to zagadnienie. Wykazałam, że wśród badanych olejków eterycznych do najsukuteczniejszych należały olejek tymiankowy > olejek cynamonowy > olejek majerankowy. Te trzy olejki wykazywały silną aktywność hamującą wobec wszystkich badanych szczepów *Cronobacter*, bez względu na przynależność gatunkową. Olejki: goździkowy, kminkowy i kopru włoskiego wykazywały umiarkowane działanie hamujące tylko na niektóre z badanych szczepów. Natomiast olejki: z mięty pieprzowej, rozmarynowy, bazyliowy, kardamonowy, anyżowy i imbirowy, jak również wszystkie olejki eteryczne z owoców cytrusowych były nieskuteczne wobec wszystkich analizowanych szczepów. Wartości MIC dla substancji pochodzenia roślinnego, wskazały na malejącą aktywność przeciwdrobnoustrojową w kolejności tymolu > aldehydu trans-cynamonowego > eugenolu > mentolu i odzwierciedlały wyniki otrzymane dla olejków, w których te substancje występują.

Za szczególnie znaczące uważam scharakteryzowanie szczepu *Cronobacter condimenti* s37 wyizolowanego z kiełków rzodkiewki, gdyż jest to drugi na świecie szczep tego gatunku. Wyniki analizy MLST i sekwencjonowania genomu tego drobnoustroju zdeponowano w GenBank oraz w bazie PubMLST, dedykowanej dla *Cronobacter* spp. W genomie szczepu s37 stwierdziłam obecność genów, determinujących kodowanie czynników wirulencji *Cronobacter* spp., m.in.: genu hemolizyny III, genów *ompA*, *ompC*, *ompL* i *ompW* kodujących białka porynowe, genów systemu sekrecyjnego typu VI (T6SS) oraz genów kodujących enterobaktynę (*entABCDFS*). U szczepu s37 stwierdziłam obecność operonu *acrAB*, kodującego białka odpowiedzialne za system usuwania leków z komórki (tzw. pompy efflux) oraz geny wskazujące na zdolność rozkładu ksylozy (*xyIA*), co może potwierdzać hipotezę, że naturalną niszą dla bakterii z rodzaju *Cronobacter* jest środowisko roślinne. Z badań antybiotykooporności wynika, że szczep s37 jest wrażliwy na ampicylinę (10 µg), gentamycynę (10 µg), chloramfenikol (30 µg), ciprofloksacynę (5 µg), tetracyklinę (30 µg), cefepim (30 µg), i cefotaksim (30 µg), a umiarkowanie wrażliwy na streptomycynę (10 µg) i kotrimoksazol (25 µg). Szczep ten jest średnio wrażliwy na olejek tymiankowy, cynamonowy, goździkowy, majerankowy oraz z kopru włoskiego. Wyznaczone wartości MIC dla tymolu, aldehydu trans-cynamonowego, eugenolu i mentolu wynosiły odpowiednio: 0,05; 0,1; 0,2 i 0,8%.

Wyniki badań w ramach głównego osiągnięcia naukowego stanowią przyczynek do wnikliwej charakterystyki i poznania dróg przenoszenia się *Cronobacter* spp. w środowisku, w tym także na człowieka i mogą się przyczynić do zrozumienia epidemiologii tych drobnoustrojów.

#### Piśmiennictwo:

- Abadias M, Usall J, Anguera M, Solsona C, Vinas I (2008): Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology* 123, 121-129.
- Agwa OK, Ossai-Chidi LN, Ezeani CA (2014): Microbial evaluation of orange fruit juice sold in Port Harcourt, Nigeria. *American Journal of Food Science and Nutrition Research* 1, 28-33.
- Aksu F, Sandikci Altunatmaz S, Issa G, Aksoy A, Aksu H (2018): Prevalence of *Cronobacter* spp. in various foodstuffs and identification by multiplex PCR. *Food Science and Technology* DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.06818>
- Almajed FS, Forsythe SJ (2016): *Cronobacter sakazakii* clinical isolates overcome host barriers and evade the immune response. *Microbiology Pathogens* 90, 55-63.
- Al-Nabulsi AA, Awaisheh SS, Osaili TM, Olaimat AN, Rahahaleh RJ, Al-Dabbas FM, Al-Kharabsheh LA, Gyawali R, Ibrahim SA (2015): Inactivation of *Cronobacter sakazakii* in reconstituted infant milk formula by plant essential oils. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 88(1), 97-101.
- Althaus D, Hofer E, Corti S, Julmi A, Stephan R (2012): Bacteriological survey of ready-to-eat lettuce, fresh-cut fruit, and sprouts collected from the Swiss market. *Journal of Food Protection* 75, 1338-1341.
- Amalaradjou MA, Hoagland TA, Venkitanarayanan K (2009): Inactivation of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted infant formula by trans-cinnamaldehyde. *International Journal of Food Microbiology* 129(2), 146-149.
- Amalaradjou MA, Venkitanarayanan K (2011a): Effect of trans-cinnamaldehyde on inhibition and inactivation of *Cronobacter sakazakii* biofilm on abiotic surfaces. *Journal of Food Protection* 74, 200-208.
- Amalaradjou MA, Venkitanarayanan K (2011b): Effect of trans-cinnamaldehyde on reducing resistance to environmental stresses in *Cronobacter sakazakii*. *Foodborne Pathogens Disease* 8, 403-409.
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formisma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9, 75.
- Banerjee M, Sarkar PK (2003): Microbiological quality of some retail spices in India. *Food Research International* 36, 469-474.
- Banerjee M, Sarkar PK (2004): Growth and enterotoxin production by sporeforming bacterial pathogens from spices. *Food Control* 15, 491-496.
- Barron JC, Forsythe SJ (2007): Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae in dehydrated powdered infant formula. *Journal of Food Protection* 70, 2111-2117.
- Baumgartner A, Grand M, Liniger M, Iversen C (2009): Detection and frequency of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in different categories of ready-to-eat foods other than infant formula. *International Journal of Food Microbiology* 136, 89-192.
- Berger CN, Sodha SV, Shaw RK, Griffin PM, Pink D, Hand P, Frankel G (2010): Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology* 12, 2385-2397.
- Berthold A (2007): Biofilmy w przemyśle spożywczym. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego* (17/30)1, 60-66.
- Beuchat LR, Kim H, Gurtler JB, Lin L-C, Ryu J-H, Richards GM (2009): *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. *International Journal of Food Microbiology* 136, 204-213.
- Bohaychuk VM, Bradbury RW, Dimock R, Fehr M, Gensler GE, King RK, Rieve R, Romero Barrios P (2009): A microbiological survey of selected Albertagrown fresh produce from farmers' markets in Alberta, Canada. *Journal of Food Protection* 72, 415-420.
- Bowen AB, Braden CR (2006): Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. *Emerging and Infection Disease* 12, 1185-1189.
- Brandão MLL, Umeda NS, Jackson E, Forsythe SJ, de Filippis I (2017): Isolation, molecular and phenotypic characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. from Brazilian retail foods. *Food Microbiology* 63, 129-138.
- Burt S (2004): Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253
- Butler JF, Garcia-Maruniak A, Meek F (2010): Wild florida house flies (*Musca domestica*) as carriers of pathogenic bacteria. *Fla Entomology* 93, 218-223.

- CAC (2008): Codex Alimentarius Commission. Code of hygienic practice for powdered formulae for infants and young children. CAC/RCP Rep. 66, FAO, New York.
- Caubilla-Barron J, Hurrell E, Townsend S, Cheetham P, Loc-Carrillo C i wsp. (2007): Genotypic and phenotypic analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from an outbreak resulting in fatalities in a neonatal intensive care unit in France. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 3979-3985.
- Chap J, Jackson P, Siqueira R, Gaspar N, Quintas C, Park J, Osaili T, Shaker R, Jaradat Z, Hartantyo SHP, Andullah Sani N, Estuningsih S, Forsythe SJ (2009): International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. *International Journal of Food Microbiology* 136, 185-188.
- Chase HR, Gopinath GR, Eshwar AK, Stoller A, Fricker-Feer C, Gangiredla J, Patel IR, Cinar HN, Jeong H, Lee C, Negrete F, Finkelstein S, Stephan R, Tall BD, Lehner A (2017): Comparative Genomic Characterization of the Highly Persistent and Potentially Virulent *Cronobacter sakazakii* ST83, CC65 Strain H322 and Other ST83 Strains. *Front. Microbiol.* 8:1136. doi: 10.3389/fmicb.2017.01136
- CLSI (2015): Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-fifth Informational Supplement. CLSI Document M100-S25.
- Devi KP, Nisha SA, Sakthivel R, Pandian SK (2010): Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella* Typhi by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology* 130, 107-115.
- Domadia P, Swarup S, Bhunia A, Sivaraman J, Dasgupta D (2007): Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochem. Pharmacol.* 74, 831-840.
- Drudy D, Mullane NR, Quinn T, Wall PG, Fanning S (2006): Food safety: *Enterobacter sakazakii*: an emerging pathogen in powdered infant formula. *Clinical and Infection Disease* 42, 996-1002.
- Drudy D, O'Rourke M, Murphy M, Mullane NR, O'Mahony R, Kelly L, Fischer M, Sanjaq S, Shannon P, Wall P, O'Mahony M, Whyte P, Fanning S (2006a): Characterization of a collection of *Enterobacter sakazakii* isolated from environmental and food sources. *International Journal of Food Microbiology* 110, 127-134.
- Edelson-Mammel SG, Porteous MK, Buchanan RL (2005): Survival of *Enterobacter sakazakii* in a dehydrated powdered infant formula. *Journal of Food Protection*, 68(9), 1900-1902.
- EFSA (2011): The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *EFSA Journal* 9 (3), 2090.
- EFSA (2015): The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 13 (12), 4329.
- Eteghad SS, Mirzaei M, Pour SF, Kahnemui S (2009): Inhibitory Effects of endemic *Thymus vulgaris* and *Mentha piperita* essential oils on *Escherichia coli* O157:H7. *Research Journal of Biological Sciences* 4(3), 340-344.
- FAO-WHO (2004): *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula. Microbiological Risk Assessment Series 6, WHO, Geneva, Switzerland.
- FAO-WHO (2006): *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula. Microbiological Risk Assessment Series 10, WHO, Geneva, Switzerland.
- FAO-WHO (2008): *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formula. Microbiological Risk Assessment Series 15, WHO, Geneva, Switzerland.
- FAO-WHO (2014): Ranking of Low Moisture Foods in Support of Microbiological Risk Management: Preliminary report of FAO/WHO expert consultation on ranking of low moisture foods. Part I – Main Report. Rome/Geneva.
- Feeney A, Johnston CD, Govender R, O'Mahony J, Coffey A, Sleator RD (2014): Analysis of the role of the *Cronobacter sakazakii* ProP homologues in osmotolerance. *Gut Pathogens* 6, 15.
- Feeney A, Kropp KA, O'Connor R, Sleator RD (2014a): *Cronobacter sakazakii*: stress survival and virulence potential in an opportunistic foodborne pathogen. *Gut Microbes* 5:6, 711-718.
- Filgueiras CT, Vanetti MCD (2006): Effect of eugenol on growth and listeriolysin O production by *Listeria monocytogenes*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49(3), 405-409
- Fisher K, Phillips CA (2006): The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology* 101, 1232-1240.
- Forsythe SJ (2018): Updates on the *Cronobacter* genus. *Annual Review of Food Science and Technology* 9, 23-44.
- Forsythe SJ, Dickins B, Jolley KA (2014): *Cronobacter*, the emergent bacterial pathogen *Enterobacter sakazakii* comes of age; MLST and whole genome sequence analysis. *BMC Genomics* 15, 1121.
- Fraňková A, Marounek M, Mozrová V, Weber J, Klouček P, Lukešová D (2014): Antibacterial activities of plant-derived compounds and essential oils toward *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus*. *Foodborne Pathogens and Disease* 11(10), 795-797.



- Freire F das CO, Offord L (2002): Bacterial and yeast counts in Brazilian commodities and spices. *Brazilian Journal of Microbiology* 33, 145-148.
- Garcia S, Iracheta F, Galván F, Heredia N (2001): Microbiological survey of retail herbs and spices from Mexican markets. *Journal of Food Protection* 64, 99-103.
- Girlich D, Poirel L, Leelaporn A, Karim A, Tribuddharat C, Fennewald M, Nordmann P (2001): Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok. *Thailand Journal of Clinical Microbiology* 39, 175-182.
- Gomez-Govea M, Solís-Soto L, Heredia N, García S, Moreno G, Tovar O, Isunza G (2012): Analysis of microbial contamination levels of fruits and vegetables at retail in Monterrey, Mexico. *Journal of Food and Agricultural Environment* 10, 152-156.
- Gurtler JB, Beuchat LR (2007): Survival of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula as affected by composition, water activity, and temperature. *Journal of Food Protection* 70, 1579-1586.
- Healy B, Cooney S, O'Brien S, Iversen C, Whyte P, Nally J i wsp. (2010): *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): an opportunistic foodborne pathogen. *Foodborne Pathogens and Disease* 7, 339-350.
- Hill LE, Gomes C, Taylor TM (2013): Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *LWT-Food Science and Technology* 51(1), 86-93.
- Hochel I, Růžičková H, Krásný L, Demnerová K (2012): Occurrence of *Cronobacter* spp. in retail foods. *Journal of Applied Microbiology* 112, 1257-1265.
- Hsiao WL, Ho WL, Chou CC (2010): Sub-lethal heat treatment affects the tolerance of *Cronobacter sakazakii* BCRC 13988 to various organic acids, simulated gastric juice and bile solution. *International Journal of Food Microbiology* 144(2), 280-284.
- Hu Q, Zhou M, Wei S (2018): Progress on the antimicrobial activity research of clove oil and eugenol in the food antiseptics field. *Journal of Food Science* 83, 1476-1480.
- Huang YT, Cheng KC, Yu RC, Chou CC (2013): Effect of ethanol shock pretreatment on the tolerance of *Cronobacter sakazakii* BCRC 13988 exposed to subsequent lethal stresses. *Foodborne Pathogens and Disease* 10(2), 165-170.
- Hurrell E, Kucerova E, Loughlin M, Caubilla-Barron J, Forsythe SJ (2009a): Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* serovars and other *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Food Microbiology* 136(2), 227-231.
- Hurrell E, Kucerova E, Loughlin M, Caubilla-Barron J, Hilton A i wsp. (2009): Neonatal enteral feeding tubes as loci for colonisation by members of the *Enterobacteriaceae*. *BMC Infection and Disease* 9, 146.
- ICMSF (2005): Spices, herbs, and vegetable seasonings. [w] ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), *Microorganisms in Foods, Microbial Ecology of Food Commodities*. Kluwer Academic/Plenum Publishers London, s. 360-372.
- Iqbal MN, Anjum AA, Ali MA, Hussain F, Ali S, Muhammad A, Irfan M, Ahmad A, Irfan M, Shabbir A (2015): Assessment of microbial load of unpasteurized fruit juices and *in vitro* antibacterial potential of honey against bacterial isolates. *Open Microbiology Journal* 9, 26-32.
- Iversen C, Forsythe S (2004): Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. *Journal of Food Microbiology* 21, 771-777.
- Iversen C, Forsythe S (2007): Comparison of media for the isolation of *Enterobacter sakazakii*. *Applied and Environmental Microbiology* 73(1), 48-52.
- Iversen C, Lane M, Forsythe SJ (2004): The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Letters in Applied Microbiology* 38(5), 378-382.
- Iversen C, Lehner A, Mullane N, Bidlas E, Cleenwerck I i wsp. (2007): The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. *BMC Evolutionary Biology* 7, 64.
- Iversen C, Mullane N, McCardell B, Tall BD, Lehner A, Fanning S i wsp. (2008): *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 1442-1447.
- Iversen C, Waddington M, Farmer JJ, Forsythe SJ (2006): The biochemical differentiation of *Enterobacter sakazakii* genotypes. *BMC Microbiology* 6, 94.
- Jang H, Addy N, Ewing L, Jean-Gilles, Beaubrun J, Lee Y, Woo J, Negrete F, Finkelstein S, Tall BD, Lehner A, Eshwar A, Gopinath GR (2018): Whole-genome sequences of *Cronobacter sakazakii* isolates obtained from foods of plant origin and dried-food manufacturing environments. *Genome Announcements* 6:e00223-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00223-18>.

- Jang SR, Bang WS (2011): Acid resistance of *Cronobacter sakazakii*. Korean Journal for Food Science of Animal Resources 31(4), 551-556.
- Jaradat Z, Ababneh Q, Saadoun I, Samara N, Rashdan A (2009): Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing. BMC Microbiology 9, 225-235.
- Jayasena DD, Cheorun J (2013): Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: a review. Trends in Food Science and Technology, 34, 96-108
- Jeddi MZ, Yunesian M, Gorji ME, Noori N, Pourmand MR, Khaniki GRJK (2014): Microbial evaluation of fresh, minimally-processed vegetables and bagged sprouts from chain supermarkets. Journal of Health Population and Nutrition 32, 391-399.
- Jeyakumar E, Lawrence R, Pal T (2011): Comparative evaluation in the efficacy of peppermint (*Mentha piperita*) oil with standards antibiotics against selected bacterial pathogens. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, S253-S257.
- Johannessen GS, Loncarevic S, Kruse H (2002): Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. International Journal of Food Microbiology 77, 199-204.
- Joseph S, Cetinkaya E, Drahovska H, Levican A, Figueras MJ, Forsythe SJ (2012): *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat and *Cronobacter universalis* sp. nov., a novel species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies 1, recovered from a leg infection, water, and food ingredients. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 62, 1277-1283.
- Joseph S, Desai P, Ji Y, Cummings CA, Shih R, Degoricija L, Rico A, Brzoska P, Hamby SE, Masood N, Hariri S, Sonbol H, Chuzhanova N, McClelland M, Furtado MR, Forsythe SJ (2012a): Comparative analysis of genome sequences covering the seven *Cronobacter* species. PLoS ONE 7:e49455
- Joseph S, Hariri S, Masood N, Forsythe S (2013): Sialic acid utilization by *Cronobacter sakazakii*. Microbial Informatics and Experimentation 3, 3.
- Jung MK, Park JH (2006): Prevalence and thermal stability of *Enterobacter sakazakii* from unprocessed ready-to-eat agricultural products and powdered infant formulas. Food Science and Biotechnology 15, 152-157.
- Kandhai MC, Heuvelink AE, Reij MW, Beumer RR, Dijk R, van Tilburg JJH, van Schothorst M, Gorris LGM (2010): A study into the occurrence of *Cronobacter* spp. in The Netherlands between 2001 and 2005. Food Control 21, 1127-1136.
- Kandhai MC, Reij MW, Gorris LG, Guillaume-Gentil O, van Schothorst M (2004): Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. Lancet 363, 39-40.
- Kandhai MC, Reij MW, Puyvelde K, Guillaume-Gentil O, Beumer RR, Van Schothorst M, (2004a): A new protocol for the detection of *Enterobacter sakazakii* applied to environmental samples. Journal of Food Protection 67, 1267-1270.
- Kędziora A, Krzyżewska E, Dudek B, Bugla-Płoskońska B (2016): Udział białek błony zewnętrznej we wrażliwości bakterii na nanosrebro. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 70, 610-617.
- Kim JB, Park YB, Kang SH, Lee MJ, Kim KCh i sp. (2011): Prevalence, genetic diversity, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) isolated from sunshik, its ingredients and soils. Food Science and Biotechnology 20, 941-948.
- Kim K, Kim K-P, Choi J, Lim J-A, Lee J i wsp. (2010): Outer Membrane Proteins A (OmpA) and X (OmpX) Are Essential for Basolateral Invasion of *Cronobacter sakazakii*. Applied and Environmental Microbiology 76(15), 5188-5198.
- Kim SA, Rhee MS (2016): Highly enhanced bactericidal effects of medium chain fatty acids (caprylic, capric, and lauric acid) combined with edible plant essential oils (carvacrol, eugenol, b-resorcylic acid, trans-cinnamaldehyde, thymol, and vanillin) against *Escherichia coli* O157:H7. Food Control 60, 447-454.
- Kim S-J, Bae Y-M, Lee S-Y (2012): Stress Response of Acid-shocked *Cronobacter sakazakii* against Subsequent Acidic pH, Mild Heat, and Organic Acids. Food Science and Biotechnology 21(1), 205-210.
- Kim K, Jang SS, Kim SK, Park JH, Heu S, Ryu S (2008): Prevalence and genetic diversity of *Enterobacter sakazakii* in ingredients of infant foods. International Journal of Food Microbiology 122, 196-203.
- Koseki S, Mizuno Y, Kawasaki S, Yamamoto K (2011): A survey of iceberg lettuce for the presence of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in Japan. Journal of Food Protection 74, 1543-1546.
- Kucerova E, Clifton SW, Xia X-Q, Long F, Porwollik S i wsp. (2010): Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species. PLoS ONE 5, 9556.
- Lai KK (2001): *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children and adults: case reports and review of the literature. Medicine 80, 113-122.
- Lee SY, Jin HH (2008): Inhibitory activity of natural antimicrobial compounds alone or in combination with nisin against *Enterobacter sakazakii*. Letters in Applied Microbiology 47(4), 315-321
- Lee YD, Park JH, Chang H (2012): Detection, antibiotic susceptibility and biofilm formation of *Cronobacter* spp. from various foods in Korea. Food Control 24, 225-230.
- Lehner A, Nitzsche S, Breeuwer P, Diep B, Thelen K, Stephan R (2006): Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection. BMC Microbiology 6, 15.

- Lehner A, Riedel K, Eberl L, Breeuwer P, Diep B, Stephan R (2005): Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: Aspects promoting environmental persistence. *Journal of Food Protection*, 68(11), 2287-2294.
- Lehner A, Stephan R (2004): Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Food Protection* 67, 2850-2857.
- Lehner A (2010): *Cronobacter* (former *Enterobacter sakazakii*) spp. - its effect in dairy product safety, quality and trade. *Australian Journal of Dairy Technology* 65, 63-67.
- Lenati RF, O'Connor DL, H'ebert KC, Farber JM, Pagotto FJ (2008): Growth and survival of *Enterobacter sakazakii* in human breast milk with and without fortifiers as compared to powdered infant formula. *International Journal of Food Microbiology* 122, 171-179.
- Li PT, Hsiao WL, Yu RC, Chou CC (2013): Effect of heat shock on the fatty acid and protein profiles of *Cronobacter sakazakii* BCRC 13988 as well as its growth and survival in the presence of various carbon, nitrogen sources and disinfectants. *Food Microbiology* 36(2), 142-148.
- Li Y, Chen Q, Zhao J, Jiang H, Lu F, Bie X, Lu Z (2014): Isolation, identification and antimicrobial resistance of *Cronobacter* spp. isolated from various foods in China. *Food Control* 37, 109-114.
- Maćkiw, E., Rzewuska, K., Tomczuk, K., Izak, D., Stoś, K. 2011. Występowanie *Cronobacter* sp. w wybranych produktach spożywczych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 77, 172-178.
- Martínez-Villaluenga C, Frías J, Gulewicz P, Gulewicz K, Vidal-Valverde C (2008): Food safety evaluation of broccoli and radish sprouts. *Food Chemistry and Toxicology* 46, 1635-1644.
- Mattson TE, Johny AK, Amalaradjou MAR, More K, Schreiber DT i wsp. (2011): Inactivation of *Salmonella* spp. on tomatoes by plant molecules. *International Journal of Food Microbiology* 144, 464-468.
- Müller A, Stephan R, Fricker-Feer C, Lehner A (2013): Genetic diversity of *Cronobacter sakazakii* isolates collected from a Swiss infant formula production facility. *Journal of Food Protection* 76, 883-887.
- Muytjens HL, Roelofs-Willems H, Jaspar GH (1988): Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* 26, 743-746.
- Nazarowec-White M, Farber JM (1997): *Enterobacter sakazakii*: a review. *International Journal of Food Microbiology* 34, 103-113.
- Nazarowec-White M, Farber JM (1999): Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Medical Microbiology* 48, 559-567.
- Ogihara H, Kiribe N, Fukuda N, Furukawa S, Morinaga Y, Igimi S (2014): *Cronobacter* spp. in commercially available dried food in Japan. *Biocontrol Sciences* 19, 209-213.
- Ojeda-Sana AM, van Baren CM, Elechosa MA, Juárez MA, Moreno S (2013): New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control* 31, 189-195.
- Olasupo NA, Fitzgerald DJ, Gasson MJ, Narbad A (2003): Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Letters of Applied Microbiology*, 37, 448-451.
- Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M (2007): Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 18, 414-420.
- Park SH, Kang DH (2014): Fate of biofilm cells of *Cronobacter sakazakii* under modified atmosphere conditions. *LWT-Food Science and Technology* 57(2), 782-784.
- Patrick ME, Mahon BE, Greene SA, Rounds J, Cronquist A i wsp. (2014): Incidence of *Cronobacter* spp. infections, United States, 2003-2009. *Emerging Infectious Diseases* 20(9), 1520-1523.
- Pava-Ripoll M, Goeriz Pearson RE, Miller AK, Ziobro GC (2012): Prevalence and relative risk of *Cronobacter* spp., *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* associated with the body surfaces and guts of individual filth flies. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 7891-7902.
- Pei RS, Zhou F, Ji BP, Xu J (2009): Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. *Journal of Food Science* 74(7), 379-383.
- PN-ISO 21528-2:2005 (2005): Mikrobiologia żywności i pasz - Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Enterobacteriaceae* - Część 2: Metoda płytkowa.
- PN-EN ISO 4833-1:2013-12 (2013): Mikrobiologia łańcucha żywnościowego - Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów - Część 1: Oznaczenie liczby metodą posiewu wgłębnego w temperaturze 30 stopni C
- PKN-ISO/TS 22964:2008 (2008): Mleko i przetwory mleczne - Wykrywanie *Enterobacter sakazakii*
- PN-EN ISO 22964:2017-06 (2017): Mikrobiologia łańcucha żywnościowego - Horyzontalna metoda wykrywania *Cronobacter* spp.



- Ragaert P, Devlieghere F, Debevere J (2007): Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 44, 185-194.
- Rashed N, Aftab U, Azizul H, Saurab KM, Mrityunjoy A, Majibur MR (2013): Microbiological study of vendor and packed fruit juices locally available in Dhaka city, Bangladesh. *International Food Research Journal* 20, 1011-1015.
- Restiano L, Frampton EW, Lionberg WC, Becker RJ (2006): A chromogenic plating medium for the isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* from food, food ingredients, and environmental sources. *Journal of Food Protection* 69, 315-322.
- Ribeiro-Santos R, Andrade M, Ramos de Melo N, Sanches-Silva A (2017): Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. *Trends in Food Science & Technology* 61, 132-140.
- Rusenova N, Parvanov P (2009): Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance. *Trakia Journal of Sciences* 7(1), 37-43.
- Santo D, Graça A, Nunes C, Quintas C (2018): *Escherichia coli* and *Cronobacter sakazakii* in 'Tommy Atkins' minimally processed mangos: Survival, growth and effect of UV-C and electrolyzed water. *Food Microbiology* 70, 49-54.
- Santurio DF, Kunz de Jesus FP, Zanette RA, Schlemmer KB, Fraton A, Martins Fries LL (2014): Antimicrobial activity of the essential oil of thyme and of thymol against *Escherichia coli* strains. *Acta Scientiae Veterinariae*, 42, 1234.
- Schmid M, Iversen C, Gontia I, Stephan R, Hofmann A i wsp. (2009): Evidence for a plant-associated natural habitat for *Cronobacter* spp. *Research in Microbiology* 160, 608-614. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.08.013>.
- Seow J, Agoston R, Phua L, Yuk HG (2012): Microbiological quality of fresh vegetables and fruits sold in Singapore. *Food Control* 25, 39-44.
- Shaker R, Osaili T, Al-Omary W, Jaradat Z, Al-Zuby M (2007): Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* sp. from food and food production environments. *Food Control* 18, 1241-1245.
- Shi C, Song K, Zhang X, Sun Y, Sui Y, Chen Y, Jia Z, Sun H, Sun Z, Xia X (2016): Antimicrobial activity and possible mechanism of action of citral against *Cronobacter sakazakii*. *PLoS ONE* 11 (7): <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159006>.
- Simforian E, Nonga HE, Ndabikunze BK (2015): Assessment of microbiological quality of raw fruit juice vended in Dar es Salaam city, Tanzania. *Food Control* 57, 302-307.
- Singh N, Goel G, Raghav M (2015): Insights into virulence factors determining the pathogenicity of *Cronobacter sakazakii*. *Virulence* 6, 5, 433-440.
- Singh N, Goel G, Raghav M (2015a): Prevalence and characterization of *Cronobacter* spp. from various foods, medicinal plants, and environmental samples. *Current Microbiology* 71, 31-38.
- Singh N, Patil A, Prabhune A, Goel G (2016): Inhibition of quorum-sensing-mediated biofilm formation in *Cronobacter sakazakii* strains. *Microbiology* 162, 1708-1714.
- Soković M, Glamoclija J, Marin PD, Brikić D, Van Griensven LJLD (2010): Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules* 15(11), 7532-7546.
- Sonbol H, Joseph S, McAuley C, Craven H, Forsythe SJ. (2013): Multilocus sequence typing of *Cronobacter* spp. from powdered infant formula and milk powder production factories. *International Dairy Journal* 30, 1-7.
- Sospedra I, Soriano J, Manes J (2010): Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs commercialized in Spain. *Plant Foods for Human Nutrition* 65, 364-368.
- Stojanović MM, Katić V, Kuzmanović J (2011): Isolation of *Cronobacter sakazakii* from different herbal teas. *Vojnosanit Pregl.* 68, 837-841.
- Tajkarimi MM, Ibrahim SA, Cliver DO (2010): Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21, 1199-1218.
- Terragno R, Salve A, Pichel M, Epsztejn S, Brengi S, Binsztein N (2009): Characterization and subtyping of *Cronobacter* spp. from imported powdered infant formulae in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 136, 193-197.
- Thippeswamy NB, Naidu KA, Achur RN (2013): Antioxidant and antibacterial properties of phenolic extract from *Carum carvi* L. *Journal of Pharmacy Research* 7, 352-357.
- Townsend SM, Hurrell E, Gonzalez-Gomez I, Lowe J, Frye JG i wsp. (2007): *Enterobacter sakazakii* invades brain capillary endothelial cells, persists in human macrophages influencing cytokine secretion and induces severe brain pathology in the neonatal rat. *Microbiology* 153, 3538-3547.
- Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, Saija S, Mazzanti G, Bisignano G (2005): Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 49, 2474-2478.
- Tserennadmid R, Takó M, Galgóczy L, Papp T, Vágvölgyi C, Gerő L, Krisch J (2010): Antibacterial effect of essential oils and interaction with food components. *Central European Journal of Biology* 5, 641-648.
- Turcovský I, Kuniková K, Drahovská H, Kaclíková E (2011): Biochemical and molecular characterization of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) isolated from foods. *Antonie van Leeuwenhoek* 99, 257-269.
- Tyagi AK, Malik A (2011): Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. *Food Control* 22, 1707-1714.

- Ueda S (2017): Occurrence of *Cronobacter* spp. in dried foods, fresh vegetables and soil. *Biocontrol Science* 22(1), 55-59.
- Valentin-Bon I, Jacobson A, Monday SR, Feng PCH (2008): Microbiological quality of bagged cut spinach and lettuce mixes. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 1240-1242.
- Van Acker J, De Smet F, Muyldermans G, Bougatef A, Naessens A, Lauwers S (2001): Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *Journal of Clinical Microbiology* 39(1), 293-297.
- Van Doren J, Neil K, Parish M, Gieraltowski L, Gould L, Gombas K (2013): Foodborne illness outbreaks from microbial contaminants in spices, 1973-2010. *Food Microbiology* 36, 456-464.
- Vasconcellos L, Carvalho CT, Overas Tavares R, de Mello Medeiros V, de Oliveira Rosas C, Nunes Silva J, dos Reis Lopes SM, Forsythe SJ, Brandão MLL (2018): Isolation, molecular and phenotypic characterization of *Cronobacter* spp. in ready-to-eat salads and foods from Japanese cuisine commercialized in Brazil. *Food Research International* 107, 353-359.
- Vojkowska H, Karpiskova R, Orieskova M, Drahovska H (2016): Characterization of *Cronobacter* spp. isolated from food of plant origin and environmental samples collected from farms and from supermarkets in the Czech Republic. *International Journal of Food Microbiology* 217, 130-136.
- Witkowska A, Hickey D, Alonso-Gomez M, Wilkinson M (2011): The microbiological quality of commercial herb and spice preparations used in the formulation of a chicken supreme ready meal and microbial survival following a simulated industrial heating process. *Food Control* 22, 616-625.
- Xu J, Zhou F, Ji B-P, Pei R-S, Xu N (2008): The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 47, 174 - 179.
- Xu X, Li Ch, Wu Q, Zhang J, Huang J, Yang G (2015): Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. in Chinese ready-to-eat foods. *International Journal of Food Microbiology* 204, 17-23.
- Ye H, Shen S, Xu J, Lin S, Yuan Y, Jones GS (2013): Synergistic interactions of cinnamaldehyde in combination with carvacrol against food-borne bacteria. *Food Control* 34 (2), 619-623.
- Zhou Y, Tao Y, Yu H, Ni J, Zeng L, Teng Q, Kim KS, Zhao GP, Guo X, Yao Y (2012): Hcp Family Proteins Secreted via the Type VI Secretion System Coordinately Regulate *Escherichia coli* K1 Interaction with Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *Infection and Immunity* 80, 1243-1251.

## 6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Po ukończeniu studiów podjęłam pracę na stanowisku asystenta w Zakładzie Technologii Mleka (obecnie Biotechnologii Mleka) w Katedrze Technologii Żywności Pochodzenia Zwierzęcego na moim macierzystym Wydziale. Od początku mojego zatrudnienia do 2006 r. zespołem kierował prof. dr hab. Stanisław Zmarlicki, w latach 2006 - 2012 - dr hab. Antoni Pluta, prof. SGGW, a aktualnie - dr hab. Małgorzata Ziarno, prof. SGGW. Tematyka prac badawczych prowadzonych przez Zespół obejmuje zagadnienia związane z opracowaniem nowych metod oznaczania mikroflory technicznej i zanieczyszczającej w produktach mleczarskich; podstawami technologii otrzymywania fermentowanych mlecznych / roślinnych produktów probiotycznych, czynnikami warunkującymi trwałość mleka spożywczego pasteryzowanego, ze szczególnym uwzględnieniem *Bacillus cereus*. W ostatnich latach nacisk został położony na badania nad wpływem parametrów technologicznych na rozkład białek, rozwój mikroflory technicznej i powstawanie w serach podpuszczkowych dojrzewających substancji aktywnych biologicznie (bioaktywne peptydy, aminy biogenne) oraz badania nad technologią produkcji funkcjonalnego sera typu holenderskiego o obniżonej zawartości tłuszczu.

Ścisła współpraca z członkami Zespołu pozwoliła mi podjąć kilka wymienionych poniżej kierunków badawczych. Wynikiem mojej dotychczasowej aktywności zawodowej jest

opracowanie koncepcji, udział w opracowaniu koncepcji lub uczestnictwo w realizacji pięciu głównych zagadnień badawczych:

- występowanie i charakterystyka *Bacillus cereus* w mleku surowym i środowisku jego pozyskiwania (pkt 6.1.),
- wpływ różnych czynników na możliwości rozwoju i tworzenia toksyny HBL przez *Bacillus cereus* (pkt 6.2.),
- możliwości rozwoju *Bacillus cereus* w warunkach symulujących pasaż żółdkowo-jelitowy (pkt 6.3.),
- wybrane aspekty technologiczne i jakościowe produkcji serów typu holenderskiego, ze szczególnym uwzględnieniem serów o obniżonej zawartości tłuszczu (pkt 6.4.),
- wybrane aspekty bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności (pkt 6.5.).

Aktualne zainteresowania naukowo-badawcze przedstawiłam w pkt 6.6.

### **6.1. Występowanie i charakterystyka *Bacillus cereus* w mleku surowym i środowisku jego pozyskiwania**

Po rozpoczęciu pracy moje główne zainteresowania naukowe dotyczyły badań nad występowaniem i charakterystyką *Bacillus cereus* w mleku surowym oraz środowiskiem jego pozyskiwania. Badania z tego zakresu realizowałam między innymi w ramach grantu promotorskiego pt: "*Studia nad występowaniem i charakterystyką Bacillus cereus w mleku i środowisku jego pozyskiwania*" KBN 6P06G03620 w latach 2001/2002. Zaowocowały one pracą doktorską oraz trzema publikacjami (IID5, IID11 i IID14) oraz czterema doniesieniami sesyjnymi (IIIB1, IIIB5, IIIB8 i IIIB14).

Dostosowanie się do wymagań unijnych dla mleka surowego i podjęte po akcesji do Unii Europejskiej działania w zakładach mleczarskich, dotyczące wprowadzania systemów jakości, doprowadziły do znacznego wydłużenia trwałości mleka spożywczego pasteryzowanego, którego trwałość wynosi teraz najczęściej co najmniej 14 dni. Postęp w tym zakresie doprowadził praktycznie do wyeliminowania zanieczyszczeń popasteryzacyjnych (wtórnych) (bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* i psychrotrofowe). Trwałość i bezpieczeństwo mleka spożywczego pasteryzowanego uzależniona jest zatem od obecności bakterii występujących w surowcu mleczarskim - psychrotrofowych bakterii przetrwalnikujących, reprezentowanych głównie przez gatunek *B. cereus*. Drobnoustroje te, oprócz powodowania niekorzystnych zmian organoleptycznych mleka pasteryzowanego, mogą wywoływać zatrucia pokarmowe. W Norwegii, która jest krajem prawie wolnym od zatruc pokarmowych wywołanych przez *Salmonella* i *Campylobacter*, to właśnie *B. cereus* jest najczęstszą przyczyną zatruc pokarmowych

[Gibbs 2002]. Ze względu na stosunkowo łagodny przebieg zatruc o charakterze „biegunkowym”, wywołanych przez *B. cereus*, zwraca się uwagę na fakt znacznego zaniżenia publikowanych danych dotyczących liczby tych zatruc. Drobnoustroje te stanowią trudny do całkowitego wyeliminowania składnik mikroflory mleka surowego. Do mleka dostają się zwykle podczas jak i po doju, zarówno w postaci komórek wegetatywnych, jak i przetrwalników [Slaghuis i wsp. 1997, Christiansson i wsp. 1999]. Przetrwalniki *B. cereus* wykazują się znaczną hydrofobowością, dzięki czemu mają zdolność przywierania do różnych powierzchni abiotycznych (tworzyw sztucznych, stali kwasoodpornej czy gumy) i tworzenia na nich biofilmów. Zanieczyszczenie tymi drobnoustrojami urządzeń do doju i przetrzymywania mleka surowego oraz linii produkcyjnych są wyjątkowo trudne do usunięcia także ze względu na ich oporność na środki myjące i dezynfekcyjne [Faille i wsp. 2001, Peng i wsp. 2001, Tauveron i wsp. 2006, Le Gentil i wsp. 2010].

W badaniach prowadzonych w latach 1996-2002 określiłam występowanie przetrwalników *B. cereus* w różnych próbkach pochodzących ze środowiska gospodarstw, które mogło być źródłem zanieczyszczenia mleka podczas i po doju (załącznik 4: IID11, IIIB1). Wykazałam, że *B. cereus* występuje powszechnie i w znacznej liczbie w środowisku pozyskiwania mleka (siano, ściółka, powietrze hali udojowej). Największe zanieczyszczenie stwierdziłam w próbkach gleby z pastwiska (3 - 5 log jtk/g) oraz kału krów (2 - 5 log jtk/g). Przetrwalniki omawianych drobnoustrojów były obecne także w liczbie do 4 log jtk/g w większości próbek (64 - 90%) pasz różnego rodzaju. Jediną drogą do znacznego ograniczenia stopnia zanieczyszczenia mleka przez *B. cereus* wydaje się zachowanie właściwego rygoru zabiegów higienicznych przed, w trakcie jak i po doju. Nieobecność przetrwalników *B. cereus* w 29% przebadanych próbek wymazów z powierzchni strzyków krów oraz w 46% próbek wymazów z powierzchni kubków udojowych wskazuje, że jest to możliwe.

W ramach badań zrealizowanych w ramach grantu promotorskiego KBN 6P06G03620 określiłam także występowanie *B. cereus* w mleku surowym, pobieranym od pojedynczych krów w dwóch gospodarstwach wielkostatdnych o różnym poziomie higieny doju (załącznik 4: IID5, IIIB14). Wykazałam istotny wpływ poziomu higieny pozyskiwania mleka na stopień zanieczyszczenia mleka komórkami wegetatywnymi/przetrwalnikami *B. cereus*. W mleku pozyskiwanym w gospodarstwie o wyższym poziomie higieny doju (obora płytka, bezściółkowa, dój w odrębnej hali udojowej, zabiegi mycia i dezynfekcji wymienia przed i po doju) ogólna liczba *B. cereus* nie przekraczała 0,3 log jtk/ml, natomiast w mleku pozyskiwanym w gospodarstwie o niższym poziomie higieny (obora ściółkowa, dój w oborze, przed dojem opłukanie wodą) liczebność *B. cereus* sięgała 2,8 log jtk/ml.

Wyizolowane szczepy *B. cereus* z mleka surowego, kału krów, gleby i trawy z pastwiska, ściółki, siana, różnych typów pasz, a także z powietrza hali udojowej, powierzchni strzyków i kubków udojowych scharakteryzowałam pod względem posiadania kilkudziesięciu cech biochemicznych i fizjologicznych (załącznik 4: IID14, IIIB5). Większość przebadanych szczepów charakteryzowało się cechami uznanymi za typowe dla *B. cereus*, choć wykazałam także istnienie szczepów (0,58%), posiadających nietypowe zdolności, np. fermentowanie D-mannitolu, co jest o tyle istotne, że brak tej cechy jest podstawą oznaczania *B. cereus* według metodyki ISO 7932 [2004]. Ze względu na pochodzenie szczepów jako szczególnie interesujące można uznać wyniki dotyczące fermentacji laktozy, co stwierdzono u 27% szczepów, przy czym większość w tej grupie stanowiły szczepy wyizolowane z mleka. Z opisu gatunku *B. cereus* w *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [1986] wynika, że bakterie te nie fermentują cukru mlecznego, natomiast z danych piśmiennictwa [Te Giffel i wsp. 1997] - że odsetek ten nie przekraczał 19%. Może to wskazywać na selekcję lub adaptację szczepów *B. cereus* do bytowania w warunkach produkcji mleka. Ponadto, chociaż niektóre ze szczepów *B. cereus* nie są zdolne fermentować laktozy, to mogą rozwijać się w produktach mlecznych, hydrolizując białka mleka lub fermentując glukozę uwalnianą po fermentacji laktozy przez konkurencyjne mikroorganizmy, na przykład bakterie kwasu mlekowego. Potwierdziłam także powszechność zdolności rozkładu czerwonych krwinek przez szczepy *B. cereus*, ale jednocześnie znaczną szczepozależność aktywności hemolizy (wyrażonej jako miano hemolizyn w kierunku rozkładu czerwonych krwinek baranich) (załącznik 4: IID14, IIIB8). Najsilniejszą aktywnością hemolityczną (miano 1/32 i 1/64) odznaczało się 40% szczepów, pochodzących ze wszystkich badanych źródeł, a najsłabszą 21% (miano hemolizyn: 1/2 i 1/4). Moje badania w tym zakresie są jednymi z nielicznych szeroko opisujących zróżnicowanie szczepów w obrębie gatunku *B. cereus*.

#### Piśmiennictwo:

- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986) pod red. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, The Williams and Wilkins Co. Baltimore, s. 1105-1139.
- Christiansson A, Bertlison J, Svensson B (1999): *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *Journal of Dairy Science* 82, 305-313.
- Faille C, Fontaine F, Benezech T (2001): Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines. *Journal of Applied Microbiology* 90, 892-900.
- Gibbs P (2002): Characteristics of spore-forming bacteria. w *Foodborne Pathogens. Hazards, Risk Analysis and Control*. pod red. Blackburn CW, McClure PJ, CRC Press New York, s. 425.
- ISO 7932 (2004): Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* - Colony-count technique at 30 degrees C.
- Le Gentil C, Sylla Y, Faille C (2010): Bacterial re-contamination of surfaces of food processing lines during cleaning in place procedures. *Journal of Food Engineering* 96(1), 37-42.
- Peng JS, Tsai WC, Chou CC (2001): Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology* 65, 105-111.



Slaghuis BA, Te Giffel MC, Beumer RR, Andre G (1997): Effect of pasturing on the incidence of *Bacillus cereus* spores in raw milk. *International Dairy Journal* 7, 201-205.

Tauveron G, Slomianny C, Henry C, Faille C (2006): Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *International Journal of Food Microbiology* 110(3), 254-262.

Te Giffel MC, Beumer RR, Granum PE, Rombouts FM (1997): Isolation and characterization of *Bacillus cereus* from pasteurized milk in household refrigerators in the Netherlands. *International Journal of Food Microbiology* 34, 307-318.

## 6.2. Wpływ różnych czynników na możliwości rozwoju i tworzenia toksyny HBL przez *Bacillus cereus*

Część badań, rozpoczętych jeszcze w ramach rozprawy doktorskiej i grantu KBN 6P06G03620, poświęciłam charakterystyce cech fizjologicznych i toksyczności szczepów *B. cereus* wyizolowanych z mleka surowego oraz próbek środowiskowych. Badania te kontynuowałam następnie już po uzyskaniu stopnia doktora, a ich wyniki opublikowałam w ramach 4 publikacji (IID6, IID15, IID16 i IID18) oraz 8 doniesień sesyjnych (IIIB12, IIIB15, IIIB23, IIIB28, IIIB29, IIIB32, IIIB41 i IIIB48).

Znaczna część moich badań w tym zakresie dotyczyła zdolności wzrostu szczepów *B. cereus* pochodzących ze środowiska, a także w późniejszych etapach badań - szczepów wyizolowanych z produktów mleczarskich (np. z mleka pasteryzowanego i serów pleśniowych) w temperaturze 4-43°C. Wiele publikacji [Jurlina i wsp. 2006, Sadek i wsp. 2006, Wijnands i wsp. 2006, Ankolekar i wsp. 2009, Godič Torkar i Seme 2009, Zhou i wsp. 2010, Samapundo i wsp. 2011] wskazuje na możliwość rozwoju *B. cereus* w niskiej temperaturze. W związku z tym, nawet niewielka początkowa liczba komórek wegetatywnych/przetrwalników psychrotrofowych szczepów tego gatunku może negatywnie wpływać na jakość i skrócenie trwałości mleka spożywczego pasteryzowanego.

Wykazałam, że najwyższa dopuszczalna w Polsce temperatura przechowywania mleka spożywczego pasteryzowanego, czyli 6°C nie gwarantuje zahamowania wzrostu psychrotrofowych szczepów *B. cereus* (załącznik 4: IID6, IID15, IIIB12). Cechy psychrotrofowe, czyli zdolność wzrostu w temperaturze 6,5°C przez 10 dni stwierdziłam u 3-7% szczepów wyizolowanych ze środowiska (kału krów, powierzchni kubków udojowych, gleby, paszy). Co ciekawe, wśród szczepów wyizolowanych z mleka surowego, mleka pasteryzowanego i serów pleśniowych odsetek psychrotrofowych był znacznie większy - odpowiednio 25, 12 i 17%. Inaczej mówiąc, wśród 78 szczepów o cechach psychrotrofowych (na łącznie 821 szczepów badanych), aż 80% pochodziło z mleka surowego i produktów mlecznych, a tylko 20% było izolatami środowiskowymi. O częstszym występowaniu szczepów psychrotrofowych w mleku i produktach mlecznych niż w innych produktach spożywczych donosił Wijnands i wsp. [2006]. U wybranych 35 szczepów określiłam także możliwości wzrostu w mleku przetrzymywanym

w niskiej temperaturze, co jest innym zagadnieniem niż określanie cech psychrotrofowych metodą klasyczną, w której wymagany jest taki rozwój, aby w temperaturze 6,5°C po 10 dniach inkubacji posiewów na podłożu stałym były widoczne kolonie (załącznik 4: IID15). Tylko nieliczne szczepy (5,7%) rozwijały się w temperaturze 4°C. W mleku przetrzymywanym w temperaturze 8°C rozwijało się 45,7% badanych szczepów, przy czym w przypadku połowy z nich po 7 dniach liczebność jtk/ml zwiększyła się o 3 - > 5 rzędów wielkości. Przyjmując, że w mleku surowym dobrej jakości liczba przetrwalników *B. cereus* nie przekracza 1 log jtk/ml, na skutek kiełkowania i proliferacji komórek wegetatywnych może nastąpić zwiększenie liczebności *B. cereus* do poziomu > 3 log jtk/ml, który uznaje się za graniczny ze względu na bezpieczeństwo zdrowotne produktów spożywczych [EFSA 2016].

Różnorodność szczepów *B. cereus* pod względem zakresu temperatury wzrostu została scharakteryzowana w publikacji IID18, której byłam współautorem. Ze względu na możliwość wzrostu w różnym zakresie temperatury wyróżnia się trzy grupy fizjologiczne *B. cereus*: 1. szczepy zdolne do wzrostu w temperaturze 6°C w czasie 10 dni, ale nie rozwijające się w temperaturze ponad 40°C (grupa szczepów typowo psychrotrofowych), 2. szczepy wykazujące wzrost zarówno w temperaturze 6°C, jak i ponad 40°C oraz 3. szczepy typowo mezofilne (nie wykazujące cech psychrotrofowości i rosnące w temperaturze ponad 40°C) [García-Armesto i Sutherland 1997]. Stosując ten podział wykazano, że wśród szczepów wyizolowanych ze środowiska i mleka surowego przeważają szczepy o charakterze mezofilnym, natomiast szczepy pochodzące z produktów mlecznych (mleka spożywczego pasteryzowanego i serów pleśniowych) częściej wykazują charakter psychrotrofowy. Wzrost pojedynczych szczepów wyizolowanych z kału krów i mleka surowego odnotowano w temperaturze 8°C dopiero 7-8 dnia inkubacji (brak wzrostu w temperaturze 4-6°C/10 dni). Wśród szczepów z mleka pasteryzowanego i serów pleśniowych wzrost pojedynczych badanych szczepów odnotowano już w 4-6 dniu inkubacji w temperaturze 6°C. W temperaturze 43°C odnotowano wzrost 98-100% szczepów z kału krów i mleka surowego oraz 79 i 64% szczepów wyizolowanych odpowiednio z mleka pasteryzowanego i serów.

Zjawisko adaptacji do wzrostu w niskiej temperaturze szczepów *B. cereus* i zdolność kiełkowania przetrwalników w tych warunkach powoduje, że bakterie te szybko rosną w żywności przechowywanej chłodniczo, powodując w konsekwencji obniżenie jej jakości, a w przypadku psychrotrofowych szczepów wytwarzających toksyny zjawisko to może również stanowić potencjalne zagrożenie dla bezpieczeństwa zdrowotnego konsumenta.

*B. cereus* jest gatunkiem o złożonej naturze. Bakterie te występują jako saprofity w glebie, mają dobrze przystosowaną fizjologię do funkcjonowania w dolnych odcinkach przewodu

pokarmowego [Barbosa i wsp. 2005], ale są również oportunistycznymi patogenami odpowiedzialnymi za miejscowe i ogólnoustrojowe infekcje [Stenfors Arnesen i wsp. 2008]. Niektóre szczepy *B. cereus* są stosowane jako probiotyki [Green i wsp. 1999, Duc i wsp. 2004, Hong i wsp. 2005], inne mogą wywoływać zatrucia pokarmowe u ludzi [EFSA 2005]. Patogenność *B. cereus* przypisuje się wytwarzaniu przez te drobnoustroje czynników takich jak fosfolipaza, cereulidyna (toksyna wymiotna), enterotoksyna HBL, toksyna niehemolityczna (NHE), hemolizyna IV i cytotoksyna (CytK), wiązana z wywoływaniem martwiczego zapalenia jelit [Agata i wsp. 1995, Beecher i wsp. 1995, 2000, Lund i wsp. 2000, Hardy i wsp. 2001]. Wyróżnia się dwa typy zatruc wywołanych przez *B. cereus*: o przebiegu wymiotnym i biegunkowym. To pierwsze ma charakter intoksykacji i wywołane jest spożyciem pokarmu już zawierającego toksynę – cereulidynę, natomiast zatrucie typu biegunkowego to typowa toksykoinfekcja, za którą odpowiada enterotoksyna HBL [EFSA 2005].

Toksyna HBL jest substancją białkową, wytwarzaną w logarytmicznej fazie wzrostu *B. cereus*. Składa się z 3 podjednostek: L1 (o masie cząsteczkowej 36 kDa), L2 (45 kDa) i B (35 kDa). Z nielicznych danych literatury [Duport i wsp. 2004, Ouhib i wsp. 2006, Thomassin i wsp. 2006] wynika, że na wytwarzanie enterotoksyny HBL mają wpływ różne czynniki, m.in. tempo wzrostu, temperatura, pH i skład środowiska hodowlanego (węglowodany, aminokwasy) oraz dostępność tlenu. Z badań przeprowadzonych przeze mnie wynika, że bez względu na to, jaki węglowodan obecny był w bulionie mózgowo-sercowym (D-glukoza, D-fruktoza, galaktoza, sacharoza lub laktoza) i w jakiej ilości (dodatek 0,50; 2,00 lub 8,00 g/l dla monosacharydów i 0,25; 1,00 lub 4,00 g/l dla disacharydów), najszybszy rozwój *B. cereus* następował między 3. a 6. godziną inkubacji. Synteza toksyny HBL pokrywała się w czasie z okresem najbardziej aktywnego wzrostu drobnoustrojów (logarytmiczna faza wzrostu). Największe ilości toksyny HBL powstawały w bulionie zawierającym 2 lub 8 g/l fruktozy oraz 8 g/l glukozy. Bez względu na wielkość dodatku galaktozy, ilości powstającej toksyny HBL były ok. 7-krotnie mniejsze niż ilości toksyny wykrytej w bulionach zawierających inne monosacharydy (załącznik 4: IIIB48). Z kolei w badaniach nad wpływem temperatury oraz medium hodowlanego na tworzenie toksyny HBL przez *B. cereus* wykazałam, że w temperaturze 20, 25 i 43°C ilości powstającej toksyny HBL były w mleku 2-4-krotnie mniejsze niż w bulionie mózgowo-sercowym. Jedynie w temperaturze 37°C, która jest optymalną dla tworzenia enterotoksyny HBL, rodzaj medium nie miało wpływu na ilość toksyny (załącznik 4: IIIB41).

Interesujące wyniki badań otrzymałam, określając zdolność tworzenia enterotoksyny HBL przez szczepy pochodzące z różnych źródeł. Mianowicie najmniejszy odsetek szczepów HBL(+) stwierdziłam wśród szczepów "środowiskowych" i wyizolowanych z mleka surowego



(41%), nieco większy - 70%, wśród szczepów wyizolowanych z mleka pasteryzowanego. Natomiast wśród szczepów pozyskanych z serów pleśniowych cechę tę posiadało aż 90% (załącznik 4: IIB15, IIB28).

Część badań nad charakterystyką szczepów *B. cereus* wyizolowanych z mleka surowego poświęciłam określeniu możliwości ich rozwoju oraz tworzenia enterotoksyny HBL w serach pleśniowych i mleku przechowywanych w warunkach chłodniczych (załącznik 4: IID16, IIB23, IIB29). Materiałem badawczym były enterotoksyczne szczepy *B. cereus*, których komórki wegetatywne w postaci zawiesiny wprowadzano na powierzchnię serów, tak aby początkowa ich liczba wynosiła ok. 4 log jtk/g sera. W serze typu Camembert, przechowywanym w temperaturze 6°C stwierdziłam stopniowe zmniejszanie się liczby *B. cereus*. W zależności od szczepu, końcowa liczba *B. cereus* po 20 dniach trwania doświadczenia wynosiła ok. 1 log jtk/g, a w przypadku drugiego badanego szczepu nie stwierdzono obecności patogenów w 0,1 g sera. W serach przechowywanych w temperaturze 12°C odnotowano zwiększanie się liczby *B. cereus* do 10. dnia eksperymentu (o ok. 3 rzędy logarytmiczne w 1 g), a następnie stopniowe jej zmniejszanie. Bez względu na temperaturę przechowywania serów typu Camembert nie stwierdzono w nich obecności toksyny HBL (załącznik 4: IIB23). Podobne wyniki otrzymałam, określając możliwości wzrostu *B. cereus* i tworzenia toksyny HBL w serach z przerostem pleśni (załącznik 4: IIB29). Z kolei w przypadku wprowadzenia inokulum komórek szczepów *B. cereus* do mleka, ich wzrost i tworzenie toksyny HBL stwierdziłam tylko w temperaturze 8°C (załącznik 4: IID16, IIB29).

#### **Piśmiennictwo:**

- Agata N, Ohta M, Mori M, Isobe M (1995): A novel dodecadeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters* 129, 17-20.
- Ankolekar Ch, Rahmati T, Labbé R (2009): Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice. *International Journal of Food Microbiology* 128, 460-466.
- Barbosa T, Serra C, La Ragione R, Woodward M, Henriques A (2005): Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 968-978.
- Beecher D, Olsen T, Somers E, Wong A (2000): Evidence for contribution of tripartite hemolysin BL, phosphatidylcholine-preferring phospholipase C and collagenase to virulence of *Bacillus cereus* endophthalmitis. *Infection and Immunity* 68, 5269-5276.
- Beecher D, Schoeni J, Lee Wong A (1995): Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity* 63, 4423-4428.
- Duc H, Hong H, Barbosa T, Henriques A, Cutting S (2004): Characterization of *Bacillus cereus* probiotics available for human use. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 2161-2171.
- Duport C, Thomassin S, Bourel G, Schmitt P (2004): Anaerobiosis and low specific growth rates enhance hemolysin BL production by *Bacillus cereus* F4430/73. *Archives in Microbiology* 182, 90-95.
- EFSA (2005): Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. in Foodstuffs. *EFSA Journal*, 1-48.
- García-Armesto MR, Sutherland AD (1997): Temperature characterization of psychrotrophic and mesophilic *Bacillus* species from milk. *Journal of Dairy Research* 64(2), 261-270.
- Godić Torkar K, Seme K (2009): Antimicrobial susceptibility,  $\beta$ -lactamase and enterotoxin production in *Bacillus cereus* isolates from clinical and food samples. *Folia Microbiology* 54, 233-238.

- Green D, Wakeley P, Page A, Barnes A, Baccigalupi L, Ricca E, Cutting S (1999): Characterization of two *Bacillus* probiotics. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4288-4291.
- Hardy S, Lund T, Granum P (2001): CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. *FEMS Microbiology Letters* 197, 47-51.
- Hong H, Duc L, Cutting S (2005): The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 813-835.
- Iurlina M, Saiz A, Fuselli S, Fritz R (2006): Prevalence of *Bacillus* spp. in different food products collected in Argentina. *LWT Food Science and Technology* 39, 105-110.
- Lund T, DeBuyser M, Granum P (2000): A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular Microbiology* 38, 254-261.
- Ouhib O, Clevel T, Schmitt P (2006): The Production of *Bacillus cereus* enterotoxins is influenced by carbohydrate and growth rate. *Current Microbiology* 53, 222-226.
- Sadek Z, Fathi F, Salem M (2006): Incidence, survival and biocontrol of psychrotrophic *Bacillus cereus* and its potential for toxin production in milk and Tallaga cheese. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 56, 419-425.
- Samapundo S, Heyndrickx M, Xhaferi R, Devlieghere F (2011): Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. *International Journal of Food Microbiology* 150, 34-41.
- Stenfors Arnesen L, Fagerlund A, Granum P (2008): From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 579-606.
- Thomassin S, Jobin MP, Schmitt P (2006): The acid tolerance response of *Bacillus cereus* ATCC14579 is dependent on culture pH, growth rate and intracellular pH. *Archives in Microbiology* 186, 229-239.
- Wijnands LM, Dufrenne JB, Rombouts FM, In't Velt PH, Van Leusden FM (2006): Prevalence of potentially pathogenic *Bacillus cereus* in food commodities in The Netherlands. *Journal of Food Protection* 69, 2587-2594.
- Zhou G, Zheng D, Dou L, Cai Q, Yuan Z (2010): Occurrence of psychrotolerant *Bacillus cereus* group strains in ice creams. *International Journal of Food Microbiology* 137, 143-146.

### 6.3. Możliwości rozwoju *Bacillus cereus* w warunkach symulujących pasaż żółdkowo-jelitowy

Studium literaturowe, dotyczące czynników toksyczności *Bacillus cereus*, przedstawiłam w publikacjach IID9 i IID23 (załącznik 4). W pierwszej z nich przedstawiłam ówczesny stan wiedzy o czynnikach toksyczności *B. cereus*, dokonałam przeglądu danych o ogniskach zatruc wywołanych tymi drobnoustrojami w różnych krajach oraz scharakteryzowałam występowanie *B. cereus* w produktach spożywczych.

Z kolei, w publikacji IID23 omówiłam ówczesny stan wiedzy na temat cereulidyny, jej budowy chemicznej, optymalnych warunków tworzenia oraz metod wykrywania w produktach żywnościowych. W publikacji tej przytoczone też zostały przypadki zatruc pokarmowych wywołanych po spożyciu żywności zanieczyszczonej cereulidyną. Toksyna wymiotna *B. cereus* jest białkowym związkiem cyklicznym o masie cząsteczkowej ok. 1,2 kDa, złożonym z czterech asymetrycznych centrów z powtarzającym się tetrapeptydem: [D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val]<sub>3</sub> [Ehling-Schulz i wsp. 2005], której cechą charakterystyczną jest wyjątkowa oporność na różne czynniki. Cereulidyna przetrzymuje ogrzewanie w temperaturze 121°C przez 90 minut oraz 2 godziny w skrajnie niskim pH 2 czy pH 11, nie tracąc swej aktywności. Również, co istotne jest ze względu na patogenność gatunku *B. cereus*, nie jest rozkładana przez enzymy trawienne - trypsynę i pepsynę [Granum 2005]. W przeciwieństwie do toksyn "biegunkowych" *B. cereus*,

cereulidyna wytwarzana jest w późnej fazie wzrostu logarytmicznego i w fazie stacjonarnej, co biorąc pod uwagę jej cykliczną budowę, może potwierdzać nierybosomalny mechanizm jej biosyntezy przy udziale enzymu syntetazy cereulidyny [Toh i wsp. 2004]. Objawy zatrucia cereulidyną, obejmujące nudności i wymioty, występują dość szybko, po 1-5 godzinach po spożyciu zanieczyszczonej żywności i utrzymują się około jednej doby. Zatrucie tego typu może powodować poważne uszkodzenia wątroby na skutek wakuolizacji mitochondriów komórek wątrobowych [Mahler i wsp. 1997]. Dawka toksyczna dla dorosłego człowieka to 400-500 µg cereulidyny [Jääskeläinen i wsp. 2003]. Wśród czynników wpływających na zwiększenie ilości powstającej toksyny wymiotnej wymienić można obniżoną temperaturę (ok. 12-21°C) w porównaniu do temperatury optymalnej wzrostu (ok. 30-32°C) [Agata i wsp. 1996, Finlay i wsp. 1999, Finlay i wsp. 2000, Häggblom i wsp. 2002], dostępność tlenu [Agata i wsp. 2002, Jääskeläinen i wsp. 2004] oraz obecność L-leucyny i L-waliny [Jääskeläinen i wsp. 2004, Kuse i wsp. 2010]. Wśród produktów spożywczych, w których wykrywano cereulidynę najczęściej były potrawy na bazie ryżu, natomiast szczepy zdolne do tworzenia cereulidyny izolowano z szerokiej gamy produktów (produktów do żywienia niemowląt i małych dzieci, lodów, makaronów i innych produktów zbożowych) [Agata i wsp. 2002, Svensson i wsp. 2006].

Studium literaturowe, dotyczące wpływu różnych czynników na przeżywanie *B. cereus* w warunkach przewodu pokarmowego człowieka, przedstawiłam w publikacjach IID28 i IID29 oraz IIA2 (załącznik 4). Do czynników ograniczających w największym stopniu przeżywalność *B. cereus* w przewodzie pokarmowym należą: niskie pH panujące w żołądku, ograniczony dostęp tlenu i obecność soli kwasów żółciowych w jelicie cienkim oraz obecność mikroflory autochtonicznej w dolnych odcinkach układu pokarmowego. Istotne znaczenie ma także zdolność adherowania przetrwalników tego gatunku do enterocytów oraz ewentualne interakcje między komórkami wegetatywnymi *B. cereus* a komórkami nabłonka jelitowego. Zdolność adaptacyjna *B. cereus* do stresogennych czynników, takich jak niskie pH, zwiększa ich przeżywalność w czasie pasażu przez żołądek. Do wstępnego przystosowania się *B. cereus* do niskiego pH może dojść w pierwotnym środowisku występowania (np. w glebie) lub w czasie procesu technologicznego produkcji żywności. Subletalne wartości pH mogą wywoływać odpowiedź adaptacyjną u bakterii, ochraniając je w czasie późniejszej ekspozycji na zabójczo niskie pH. Mechanizm ten, znany jako ATR (z ang. acid tolerance response), jest ważnym elementem przystosowania się do przeżycia pasażu przez żołądek, który obserwuje się u różnych patogenów jelitowych [Merrel i Camili 2002]. Tego typu mechanizm wykazano również u komórek wegetatywnych *B. cereus* [Thomassini i wsp. 2006]. Kwasowość w żołądku może osiągnąć wartości pH nawet ponad 4,0 (w zależności od ilości i składu pokarmu czy cech

osobniczych człowieka), a więc wartości, przy której przeżywają komórki wegetatywne *B. cereus*. Znaczenie ma także czas pasażu przez żołądek, który im jest krótszy tym liczba żywych komórek *B. cereus* dostających się do jelit będzie większa. Wyniki badań *in vitro*, świadczące o możliwości przeżycia komórek wegetatywnych w środowisku żołądkowym (w tym także wyniki moich badań przedstawione poniżej), a także w warunkach jelitowych, dowodzą, że postać życiowa tych drobnoustrojów ma mniejszy wpływ na wystąpienie objawów chorobowych niż uważano dotąd. Po barierze niskiego pH w żołądku, kolejnym czynnikiem przeciwdrobnoustrojowym w przewodzie pokarmowym jest obecność kwasów żółciowych, których stężenie w jelicie cienkim waha się od około 0,2 do 2,0% wag./objęt., w zależności od cech osobniczych oraz składu i ilości spożytego pokarmu [Kristoffersen i wsp. 2007]. Sposób oddziaływania soli kwasów żółciowych na drobnoustroje zależy m.in. od ich stężenia: wysokie stężenie soli kwasów żółciowych powoduje natychmiastową śmierć komórki na skutek rozpuszczenia tłuszczu zawartego w błonie komórkowej, dysocjacji zawartych w niej białek, uszkodzenia kwasów nukleinowych oraz enzymów uczestniczących w budowie DNA. Natomiast niskie stężenie soli kwasów żółciowych narusza stabilność i integralność błony komórkowej oraz wpływa na aktywność niektórych enzymów, zaburza systemy transportu do - i z - komórki, zmienia hydrofobowość oraz potencjał elektryczny komórek. Ponadto, wolne atomy tlenu wytwarzane przez żółć stają się reagentem w reakcjach oksydacyjnych. Sole kwasów żółciowych chelatują także wapń i żelazo, co ogranicza dostępność tych makroelementów dla bakterii [Begley i wsp. 2005]. Zdolność kiełkowania przetrwalników i rozwój komórek wegetatywnych *B. cereus* obserwowano w obecności 0,10-0,15% soli kwasów żółciowych [Wijnands i wsp. 2006, Ceuppens i wsp. 2012c, Vaz i wsp. 2012]. Do wystąpienia zatrucia biegunkowego, wywołanego przez *B. cereus*, konieczna jest interakcja między komórkami tego patogenu a enterocytami. Adhezja przetrwalników *B. cereus* do enterocytów umożliwia skolonizowanie i pozostanie w tym środowisku w czasie wystarczającym do wykiełkowania i namnożenia się do odpowiednio dużej liczebności, ale także zapewnia wytworzenie enterotoksyn w bliskości nabłonka, co zapobiega ich inaktywacji [Andersson i wsp. 1998, Ramarao i Lereclus 2006, Wijnands i wsp. 2007]. Wyniki najnowszych badań nad wpływem autochtonicznej mikroflory jelitowej (*Bifidobacterium*, bakterie z grupy *coli*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*) na przeżywalność *B. cereus* w czasie pasażu jelitowego [Ceuppens i wsp. 2012a, 2012c] każą w pewnym stopniu zrewidować hipotezy, dotyczące genezy zatrucia biegunkowego wywołanego przez te drobnoustroje. Wydaje się, że do zatrucia typu biegunkowego nie jest warunkiem koniecznym, jak dotąd uważano, spożycie pokarmu silnie zanieczyszczonego przetrwalnikami *B. cereus* i znaczne namnożenie się tych drobnoustrojów w jelitach, ale miejscowy rozwój i wytworzenie enterotoksyn

w bezpośrednim kontakcie z powierzchnią komórek nabłonka. Poza tym, u zdrowego człowieka mikroflora jelitowa hamuje rozwój komórek wegetatywnych *B. cereus*, co być może stanowi ostatni element obrony organizmu przed tymi patogenami.

Zagadnienia, dotyczące określenia możliwości przetrwania *B. cereus* w warunkach symulujących pasaż żołądkowy, były tematem dwóch publikacji oryginalnych IID17, IIA1 oraz doniesienia sesyjnego IIIB50 (załącznik 4), których byłam głównym autorem. Wystąpienie zatrucia typu "biegunkowego", wywołanego przez *B. cereus*, zależy od przedostania się tych drobnoustrojów do jelita cienkiego, które ogranicza m.in. bardzo wysoka kwasowość występująca w żołądku. W żołądku na czczo panuje niskie pH (średnio około 2,0), ale w czasie przyjmowania posiłku może ono osiągnąć wartości w zakresie 4,5-5,0 [Dressman i wsp. 1990]. W konsekwencji, przy tak podwyższonym pH w żołądku również komórki wegetatywne *B. cereus* (oprócz przetrwalników) mogą przetrwać pasaż żołądkowy i dotrzeć do jelita cienkiego. Na ułatwienie komórkom wegetatywnym *B. cereus* pokonania bariery niskiego pH soku żołądkowego mogą mieć wpływ również krótki czas trawienia pokarmu w żołądku oraz występowanie w pokarmie substancji ochronnych, np. tłuszczu. Celem przeprowadzonych przeze mnie badań było określenie przeżywalności komórek wegetatywnych i przetrwalników *B. cereus* w warunkach imitujących środowisko żołądka człowieka po spożyciu zanieczyszczonych tym gatunkiem produktów mlecznych i mięsnych. Materiałem badawczym w obu publikacjach (IID17 i IIA1) były enterotoksyczne szczepy *B. cereus*, wyizolowane z mleka surowego lub środowiska jego pozyskiwania. Stosowano pożywkę według Clavel i wsp. [2004], imitującą środowisko żołądka (Gastric Medium - GM) zawierającą sole (NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, KCl, CaCl<sub>2</sub>), pepsynę i dodatek mleka UHT (o zawartości tłuszczu 0% lub 3,2%) lub wyciągu z mięsa kurczaka, a następnie regulowano jej pH (od 2,0 do 4,5). Inkubację prowadzono przez 6 h, w temperaturze 37°C w warunkach dostępu tlenu. Wykazałam, że bakterie *B. cereus*, dostające się do przewodu pokarmowego człowieka, zdolne są do przetrwania warunków panujących w środowisku żołądka, a przeżywalność w tych warunkach zależy od formy komórek (komórki wegetatywne lub przetrwalniki), pH środowiska oraz rodzaju pokarmu, który jest ich nośnikiem. Przetrwalniki *B. cereus* są wysoce odporne na kwasowość środowiska żołądka człowieka zarówno wypełnionego treścią pokarmową (pH~4,5), jak i niewypełnionego (pH~2,0), bez względu na rodzaj pokarmu, z którym wprowadzone są do żołądka. Komórki wegetatywne *B. cereus* wykazują zróżnicowaną oporność na warunki panujące w środowisku żołądka człowieka, w zależności od pH (stopnia jego wypełnienia treścią pokarmową) oraz rodzaju pokarmu, z jakim bakterie te zostają do niego wprowadzone. Bez względu na wariant pożywek GM o pH 2,0 i 2,5 w przypadku inokulum zawierającego komórki wegetatywne od 2. godziny inkubacji nie



stwierdzono już obecności *B. cereus* w 1 ml pożywek. Interesujące jest, że komórki wegetatywne wykazywały podobną przeżywalność w pożywce GM z mlekiem 3,2% tłuszczu o pH 4,5, jak przetrwalniki. W tej pożywce przeżywalność komórek wegetatywnych wynosiła ok. 85%, w pożywce GM z mlekiem odtłuszczonym - ok. 35% i jedynie 4,5% w pożywce GM zawierającej dodatek wyciągu mięsnego (załącznik 4: IIA1, IID17, IIB50). Otrzymane wyniki znajdują potwierdzenie w danych piśmiennictwa [Clavel i wsp. 2004; Wijnands i wsp. 2006, 2009; Ceuppens i wsp. 2012a, 2012b, 2012c].

#### Piśmiennictwo:

Agata N, Ohta M, Mori M, Isobe M (1996): Production of an emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*. *Current Microbiology* 33, 67-69.

Agata N, Ohta M, Yokoyama K (2002): Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *Journal of Clinical Microbiology* 73, 23-27.

Andersson A, Granum PE, Rönner U (1998): The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. *International Journal of Food Microbiology* 39, 93-99.

Begley M, Gahan CGM, Hill C (2005): The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 625-651.

Ceuppens S, Uyttendaele M, Drieskens K, Rajkovic A, Boon N, Wiele TV (2012a): Survival of *Bacillus cereus* vegetative cells and spores during in vitro simulation of gastric passage. *Journal of Food Protection* 75(4), 690-694.

Ceuppens S, Uyttendaele M, Hamelink S, Boon N, Wiele TV (2012b): Inactivation of *Bacillus cereus* vegetative cells by gastric acid and bile during in vitro gastrointestinal transit. *Gut Pathogens* 4, 11-17.

Ceuppens S, Wiele T, Rajkovic A, Ferrer-Cabacera T, Heyndrickx M, Boon N, Uyttendaele M (2012c): Impact of intestinal microbiota and gastrointestinal conditions on the in vitro survival and growth of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology* 155, 241-246.

Clavel T, Carlin F, Lairon D, Nguyen-The C, Schmitt P (2004): Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *Journal of Applied Microbiology* 97, 214-219.

Dressman J, Berardi R, Dermentzoglou L, Russel T, Schmalts S, Barnett J, Jarvenpaa K (1990): Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women. *Pharmaceutical Research* 7, 756-761.

Ehling-Schulz M, Vukov N, Schulz A, Shaheen R, Andersson M, Märtlbauer E (2005): Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 71(1), 105-113.

Finlay W, Logan N, Sutherland A (1999): Semiautomated metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin. *Applied and Environmental Microbiology* 65(4), 1811-1812.

Finlay W, Logan N, Sutherland A (2000): *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures. *Letters of Applied Microbiology* 3, 385-389.

Granum P (2005): *Bacillus cereus*. w *Foodborne Pathogens. Microbiology and Molecular Biology* pod red. Fratamico P., Bhunie A., Smith J., Caister Academic Press Norfolk, s. 409-419.

Häggbloom M, Apetroaie C, Andersson M, Salkinoja-Salonen M (2002): Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2479-2483.

Jääskeläinen E, Häggbloom M, Andersson M, Salkinoja-Salonen M (2004): Atmospheric oxygen and other conditions affecting the production of cereulide by *Bacillus cereus* in food. *International Journal of Food Microbiology* 96, 75-83.

Jääskeläinen E, Teplova V, Andersson M, Andersson L, Tammela P, Andersson M, Pirhonen T, Saris N, Vuorela P, Salkinoja-Salonen M (2003): In vitro assay for human toxicity of cereulide, the emetic toxin produced by food poisoning *Bacillus cereus*. *Toxicology In Vitro* 17, 737-744.

Kristoffersen SM, Ravnum S, Tourasse NJ, Økstad OA, Kolstø AB, Davies W (2007): Low concentrations of bile salts induce stress responses and reduce motility in *Bacillus cereus* ATCC 14570. *Journal of Bacteriology* 189, 5302-5313.

Kuse M, Franz T, Koga K, Suwan S, Isobe M, Agata N, Ohta M (2010): High incorporation of L-aminoacids to cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 10, 735-739.

Mahler H, Pasi A, Kramer J, Schulte P, Scoging A, Bar W, Krahenbuhl S (1997): Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *New England Journal of Medicine* 336, 1142-1148.

Merrel DS, Camilli A (2002): Acid tolerance of gastrointestinal pathogens. *Current Opinion in Microbiology* 5, 51-55.

Ramarao N, Lereclus D (2006): Adhesion and cytotoxicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* to epithelial cells are FlhA and PlcR dependent, respectively. *Microbes and Infection* 8, 1483-1491.

Svensson B, Monthán A, Shaheen R, Andersson M, Salkinoja-Salonen M, Christiansson A (2006): Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain. *International Dairy Journal* 16, 740-749.

Toh M, Moffitt M, Henrichsen L, Raftery M, Barrow M, Cox J, Marquis C, Neilan B (2004): Cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, is putatively a product of nonribosomal peptide synthesis. *Journal of Applied Microbiology* 97, 992-1000.

Vaz M, Hogg T, Couto JA (2012): The antimicrobial effect of wine on *Bacillus cereus* in simulated gastro-intestinal conditions. *Food Control* 28, 230-236.

Wijnands L, Dufrenne J, Zwietering M, van Leusden F (2006): Spores from mesophilic *Bacillus cereus* strains germinate better and grow faster in simulated gastro-intestinal conditions than spores from psychrotrophic strains. *International Journal of Food Microbiology* 112, 120-128.

Wijnands L, Dufrenne J, van Leusden FM, Abee T (2007): Germination of *Bacillus cereus* spores is induced by germinants from differentiated Caco-2 cells, a human cell line mimicking the epithelial cells of the small intestine. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5052-5054.

Wijnands L, Pielat A, Dufrenne J, Zwietering M, van Leusden F (2009): Modeling the number of viable vegetative cells of *Bacillus cereus* passing through the stomach. *Journal of Applied Microbiology* 106, 258-267.

#### **6.4. Wybrane aspekty technologiczne i jakościowe produkcji serów typu holenderskiego, ze szczególnym uwzględnieniem serów o obniżonej zawartości tłuszczu**

Technologia produkcji serów podpuszczkowych dojrzewających o obniżonej zawartości tłuszczu, które zyskały popularność na przełomie wieków, wymaga wprowadzenia licznych zmian parametrów produkcji, które nie mogą ograniczać się jedynie do wykorzystywania surowca o obniżonej zawartości tłuszczu (mleka odtłuszczonego), gdyż tego typu podejście prowadzi do otrzymania serów o uboższych cechach sensorycznych i o nietypowej konsystencji (gumowatość, kruchość, ziarnistość). Liczne wady serów podpuszczkowych dojrzewających dostępnych na rynku polskim i skandynawskim opisane zostały m.in. w doniesieniu sesyjnym IIB19 (załącznik 4). W publikacji IID10 oraz doniesieniu sesyjnym IIB13 (załącznik 4) wykazaliśmy, że zmiany liczebności drobnoustrojów kazeolitycznych, lipolitycznych oraz pozostałych mają podobny przebieg w serach typu holenderskiego o obniżonej zawartości tłuszczu, jak również w ich pełnotłustych odpowiednikach, co może wskazywać, że za uboższe cechy sensoryczne nie odpowiada liczebność i aktywność mikroflory.

Uczestniczyłam w pracach Zespołu kierowanego przez dr hab. Antoniego Plutę, prof. SGGW, badającego wpływ różnych zmian w procesie technologicznym produkcji serów typu holenderskiego o obniżonej zawartości tłuszczu (dodatek hydrokoloidów, lecytyny lub odtłuszczonego proszku mlecznego do mleka serowarskiego, ultrafiltracja mleka serowarskiego, zwiększenie ilości odczerpywanej serwatki, zmniejszenie temperatury dogrzewania gęstwy serowej oraz skrócenie czasu prasowania serów) (załącznik 4: IID12, IIB11, IIB20, IIB40, IIB45 i IIB46). Efektem naszych badań było opracowanie technologii produkcji sera podpuszczkowego dojrzewającego typu holenderskiego o obniżonej zawartości tłuszczu, która została wdrożona w Spółdzielni Mleczarskiej Mazowsze w Chorzeliach. Prace

z tego zakresu były również prowadzone w ramach wykonania dwóch zadań badawczych projektu celowego MNiSW nr 6ZR9 2008C/07148, realizowanych dla Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego w Warszawie w latach 2009-2012 (załącznik 4: II I3).

Dojrzewanie serów podpuszczkowych to proces złożony, wielokierunkowy i nie do końca jeszcze poznany. Od strony technologicznej i ekonomicznej jest etapem najdłuższym i kosztochłonnym. Czas dojrzewania serów jest dość zróżnicowany i trwa od kilku dni, w przypadku serów miękkich, do ponad 2 lat dla serów bardzo twardych. Skrócenie więc etapu dojrzewania serów, przy jednoczesnym utrzymaniu właściwych, typowych cech jakościowych danego gatunku sera, nadal jest wyzwaniem technologicznym. Do najczęściej stosowanych metod skracania etapu dojrzewania serów należą: podwyższenie temperatury dojrzewania, dodatek preparatów enzymatycznych, zastosowanie zwiększonej populacji wyselekcjonowanych drobnoustrojów oraz dodatek genetycznie modyfikowanych starterów. Większość z nich powoduje wady sensoryczne serów. Pewnym rozwiązaniem jest stosowanie, oprócz startera podstawowego, także startera dodatkowego [El Soda 2002] o obniżonej aktywności fermentacyjnej (konieczne ze względu na ewentualne przekwaszanie masy serowej, powodujące np. trudności z nadmiernym osuszaniem ziarna i w konsekwencji obniżoną zawartością wody w serze), przy zachowanej aktywności proteolitycznej, co osiąga się np. przez poddanie startera obróbce termicznej [Klein i Lortal 1999, Law 2001, El-Tanboly i wsp. 2010]. W technologii serowarstwa zastosowanie dodatkowych, pozbawionych aktywności fermentacyjnej starterów w produkcji serów jest znane. Jednak w badaniach z tego zakresu stosowano stosunkowo niską temperaturę i krótkie czasy obróbki termicznej dodatkowych starterów (do kilkunastu sekund), co pozwalało zachować ich wysoką aktywność proteolityczną [Farkye i wsp. 1995, Skeie i wsp. 1995, Fox i wsp. 1996, Skeie i wsp. 1997, El-Etriby i wsp. 1998, Salomskiene 1998, Klein i Lortal 1999]. Jedną z wad takiego rozwiązania, jest zachowanie wyższej aktywności proteolitycznej dodatkowego ogrzewanego startera w porównaniu z jego aktywnością peptydolityczną, co bardzo często powoduje nagromadzenie w serze gorzkich peptydów i defekty smakowe. Inną wadą jest konieczność stosowania do obróbki termicznej dodatkowego startera ciągłych wymienników ciepła o małej wydajności, co generuje koszty inwestycyjne i jest uciążliwe eksploatacyjnie. Innowacyjność rozwiązania zaproponowanego w patencie nr 219408 pt: "*Sposób otrzymywania sera dojrzewającego, sposób otrzymywania zakwasu, zakwas i ser dojrzewający*" (załącznik 4: IIB1), którego byłam współautorem, jest zastosowanie dodatkowego startera poddanego obróbce termicznej, sięgającej kilkudziesięciu minut w temperaturze

w zakresie od 50 do 80°C, czyli znacznie dłuższej niż w znanych rozwiązaniach, co pozwala na realizowanie tego procesu metodą periodyczną w maceczniku.

We wstępnych badaniach z tego zakresu (załącznik 4: IIA3) porównano aktywność dipeptydaz powszechnie stosowanych, handlowych kultur bakterii mlekowych (starter CHN-19, Chr. Hansen, skład: *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, *L. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* oraz starter XT-312, Chr. Hansen, skład: *L. lactis* ssp. *cremoris*, *Leuc. mesenteroides* ssp. *cremoris*, *L. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *L. lactis* ssp. *lactis*, *Leuc. pseudomesenteroides*), poddanych obróbce cieplnej w czasie 15 sekund lub 10 minut w temperaturze w zakresie od 50 do 80°C. Wykazano, że poddane obróbce cieplnej kultury bakterii mlekowych w dużym stopniu zachowywały aktywność peptydolityczną. Peptydazy obu badanych starterów charakteryzowała wysoka specyficzność substratowa wobec dipeptydów zawierających aminokwasy hydrofobowe, takie jak leucyna i fenyloalanina, których obecność często stwierdzana jest w gorzkich peptydach. Aktywność tych dipeptydaz stwierdzono także po obróbce termicznej, nawet w temperaturze 80°C przez 10 minut. Dodatkowo stwierdzono, że obróbka termiczna starterów w badanym zakresie temperatury opóźniała wzrost bakterii od kilku do kilkunastu godzin, co może być pozytywne z punktu widzenia produkcji serów podpuszczkowych, ponieważ dodatkowa biomasa komórek bakterii, niezdolna do wzrostu w początkowych etapach produkcji serów, ale posiadająca aktywne enzymy peptydolityczne, przyspiesza proces dojrzewania sera i zapobiega gromadzeniu gorzkich peptydów w masie serowej.

W kolejnych badaniach nad wykorzystaniem dodatkowego startera poddanego obróbce termicznej (załącznik 4: IIA4) materiałem badawczym były sery typu holenderskiego o obniżonej zawartości tłuszczu, otrzymane w warunkach przemysłowych, do produkcji których jako starter podstawowy wykorzystano kulturę CHN-19, a jako starter dodatkowy kulturę XT-312, którą poddano ogrzewaniu w temperaturze 65°C w czasie 10 lub 30 minut. Określono zmiany zachodzące w serach w czasie dojrzewania, m.in. we frakcjach azotowych (zawartość azotu rozpuszczalnego przy pH 4,6, azotu rozpuszczalnego w kwasie trichlorooctowym (TCA) i azotu amoniakalnego), zmiany mikrobiologiczne, teksturalne i sensoryczne. Zastosowanie dodatkowego, poddanego obróbce termicznej startera (65°C/10 lub 30 minut) powodowało istotne przyspieszenie procesu dojrzewania serów w porównaniu z serami kontrolnymi, otrzymanymi bez dodatkowego startera. Zawartość wszystkich badanych form związków azotowych była istotnie większa w serach wyprodukowanych z zastosowaniem dodatkowego ogrzewanego startera. Zmiany zawartości różnych form azotu rozpuszczalnego w serach są miarą zakresu ich dojrzałości, natomiast zawartość azotu amoniakalnego wskazuje na głębokość

dojrzewiania sera [McSweeney i Fox 1997, Benfeldt i Sorensen 2001]. Zastosowanie dodatkowego ogrzewanego startera (bez względu na czas jego ogrzewania) znacznie zmniejszyło twardość serów o obniżonej zawartości tłuszczu w porównaniu z serami kontrolnymi, co dowodzi, że zastosowanie dłuższego czasu obróbki termicznej (10-30 minut) korzystniej wpływało na intensyfikację proteolizy, a dzięki temu zmniejszenie twardości serów. Zazwyczaj konsekwencją obniżania kaloryczności (zawartości tłuszczu) serów typu holenderskiego jest wzrost ich twardości [Fenelon i Guinee 2000, Küçüköner i Haque 2003].

#### **Piśmiennictwo:**

Benfeldt C, Sorensen J (2001): Heat treatment of cheese milk: effect on proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal* 11, 567-574.

El Soda M (2002): Accelerated cheese ripening. w *Encyclopedia of Dairy Science* pod red. H. Roginski, J.W. Fuguay, P.F. Fox, Academic Press Amsterdam, tom 1, s. 327-329.

El-Etriby HM, Al-Khamy AF, Zaghoul AH, Shahein NM, El-Sheikh MM (1998): Effect of heat-shocked starter on the ripening of UF Edam cheese. *Egyptian Journal of Dairy Science* 26, 131-138.

El-Tanboly El-S, El-Hofi M, Youssef YB, El-Desoki W, Jalil RA (2010): Influence of freeze-shocked mesophilic lactic starter bacteria and adjunct lactobacilli on the rate of ripening Gouda cheese and flavor development. *Journal of American Science* 6(11), 465-471.

Farkye N, Madkor S, Atkins H (1995): Proteolytic abilities of some lactic acid bacteria in model cheese system. *International Dairy Journal* 5, 715-725.

Fenelon MA, Guinee TP (2000): Primary proteolysis and textural changes during ripening in Cheddar cheeses manufactured to different fat content. *International Dairy Journal* 10, 151-158.

Fox PF, Wallance JM, Morgan S, Lynch CM, Niland EJ, Tobin J (1996): Acceleration of cheese ripening. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 271-297.

Klein N, Lortal S (1999): Attenuated starters: an efficient means to influence cheese ripening – a review. *International Dairy Journal* 9, 751-762.

Küçüköner E, Haque ZU (2003): Physico-chemical and reological properties of full fat and low fat Edam cheeses. *European Food Research and Technology* 217, 281-286.

Law BA (2001): Controlled and accelerated cheese ripening: The research base for New technology. *International Dairy Journal* 11, 383-398.

McSweeney PLH, Fox PF (1997): Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Lait* 77, 41-76.

Salomskiene J (1998): Use of heat-treated starter for the intensification of cheese ripening. *Milchwissenschaft* 53, 28-30.

Skeie S, Narvhus J, Ardö Y, Abrahamsen RK (1995): Influence of liposome – encapsulated Neutrase and heat-treated lactobacilli on quality of low-fat Gouda-type cheese. *Journal of Dairy Research* 62, 131-139.

Skeie S, Narvhus J, Ardö Y, Thorvaldsen K, Abrahamsen RK (1997): The effect of reduced salt content on the function of liposome-encapsulated Neutrase and heat-treated lactobacilli in rindless low-fat cheese. *Lait* 77, 575-585.

## **6.5. Wybrane aspekty bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności**

Od początku mojej pracy w Zakładzie Biotechnologii Mleka SGGW prowadziłam badania, poświęcone określaniu jakości mikrobiologicznej różnych produktów spożywczych. Wyniki posłużyły do przygotowania siedmiu publikacji oryginalnych oraz dwunastu doniesień sesyjnych, szczególnie z zakresu: jakości serów podpuszczkowych dojrzewających (załącznik 4: IID1, IID3, IID24, IID27 oraz IIB2, IIB18, IIB22, IIB25, IIB26, IIB27, IIB33), jogurtów (załącznik 4: IID4 oraz IIB4), lodów (załącznik 4: IID7 oraz IIB17), preparatów do żywienia



niemowląt i małych dzieci (załącznik 4: IIB30), produktów zbożowych (załącznik 4: IIB42) oraz przypraw i ziół (załącznik 4: IID26 i IIB31).

Aspektem zagrożeń związanych z występowaniem wirusów i bakterii patogennych np. *Listeria monocytogenes* i *Escherichia coli* w produktach żywnościowych poświęciłam cztery artykuły przeglądowe (załącznik 4: IID20, IID21, IID32 i IID36). W publikacjach IID34 i IID35 (załącznik 4) przedstawiłam bardzo szczegółową charakterystykę, występowanie w mleku surowym i produktach mlecznych oraz aspekty związane z ciepłoopornością *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

## 6.6. Aktualne zainteresowania naukowo-badawcze

Do aktualnie realizowanych przeze mnie zagadnień badawczych zaliczam:

1. Zastosowanie bakterii octowych do biokonwersji produktów odpadowych (np. glicerolu odpadowego - publikacje IIA5 i IID37 oraz serwatki kwaśnej i podpuszczkowej - rozpoczęte wstępne prace badawcze),
2. Badania nad możliwością zwiększania w serach podpuszczkowych dojrzewających zawartości substancji aktywnych biologicznie, np. bioaktywnych dipeptydów (anseryny i L-karnozyny) oraz wolnych aminokwasów (np. ornityny), i jednocześnie ograniczania powstawania niekorzystnych amin biogennych, dzięki wykorzystaniu dodatkowych kultur bakteryjnych (publikacja IIA6 oraz 3 kolejne w trakcie recenzji).

L-karnozyna i jej metylowany analog - anseryna występują w mięśniach szkieletowych i tkance nerwowej, a ich zawartość w organizmie człowieka zależy od płci (wyższy poziom u mężczyzn), wieku (stężenie obniża się wraz z wiekiem) i diety (u wegetarian poziom obu związków jest niższy) [Stuerenburg 2000, Boldyrev i wsp. 2013]. Zakłada się, że L-karnozyna jest endogennym środkiem neuroprotektynowym przeciwdziałającym starzeniu się [Mori i wsp. 2015], a suplementacja diety karnozyną może być skuteczna w zapobieganiu lub leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona czy Alzheimerera [Chez i wsp. 2002, Szcześniak i wsp. 2014]. L-karnozyna jest także naturalnym inhibitorem enzymu konwertazy angiotensyny i może uczestniczyć w regulacji ciśnienia tętniczego, wykazuje właściwości antyproliferacyjne oraz może wpływać na pracę układu sercowo-naczyniowego [Roberts i Zaloga 2000]. Dane dotyczące występowania L-karnozyny i anseryny w produktach spożywczych dotyczą głównie produktów mięsnych [Tomonaga i wsp. 2007], natomiast brak danych o występowaniu tych dipeptydów w serach. Z kolei, ornityna zwiększa efektywność zużycia energii w organizmie [Sugino i wsp. 2008].

**Piśmiennictwo:**

- Boldyrev AA, Aldini G, Derave W (2013): Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiological Reviews* 93, 1803-1845.
- Chez MG, Buchanan CP, Aimonovitch MC, Becker M, Schaefer K, Black C, Komen J (2002): Double-blind, placebo-controlled study of L-carnosine supplementation in children with autistic spectrum disorders. *Journal of Child Neurology* 17, 833-837.
- Mori M, Mizuno D, Konoha-Mizuno K, Sadakane Y, Kawahara M (2015): Quantitative analysis of carnosine and anserine in foods by performing high performance liquid chromatography. *Biomedical Research on Trace Elements* 26(3), 147-152.
- Roberts PR, Zaloga GP (2000): Cardiovascular effects of carnosine. *Biochemistry* 65, 856-861.
- Stuenerburg HJ (2000): The roles of carnosine in aging of skeletal muscle and in neuromuscular diseases. *Biochemistry* 65, 862-865.
- Sugino T, Shirai T, Kajimoto Y, Kajimoto O (2008): L-ornithine supplementation attenuates physical fatigue in healthy volunteers by modulating lipid and amino acid metabolism. *Nutrition Research* 28, 738-743.
- Szcześniak D, Budzeń S, Kopeć W, Rymaszewska J (2014): Anserine and carnosine supplementation in the elderly: Effects on cognitive functioning and physical capacity. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 59(2), 485-490.
- Tomonaga S, Hayakawa T, Yamane H, Maemura H, Sato M, Takahata Y, Morimatsu F, Furuse M (2007): Oral administration of chicken breast extract increases brain carnosine and anserine concentrations in rats. *Nutritional Neuroscience* 10, 181-186.

**6.7. Podsumowanie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

W ramach pracy doktorskiej, a zwłaszcza po uzyskaniu stopnia doktora nauk rolniczych nieustannie doskonaliłam swój warsztat, prowadząc badania z zakresu mikrobiologii mleczarskiej, mikrobiologii produktów spożywczych, jak również technologii produktów mlecznych. Byłam autorką lub współautorką koncepcji większości prowadzonych przez mnie badań. Badania realizowałam samodzielnie lub we współpracy ze specjalistami w dziedzinie mikrobiologii, genetyki i biotechnologii z ośrodków krajowych (Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego w Warszawie, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie oraz Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie) oraz zagranicznych (School of Science and Technology w Nottingham Trent University, UK oraz The Energy and Resources Institute w New Delhi, Indie).

Istotnym kierunkiem badawczym, który zrealizowałam były badania poświęcone występowaniu i charakterystyce *Bacillus cereus*, ze szczególnym uwzględnieniem jego potencjału chorobotwórczego. Wykazałam występowanie tych drobnoustrojów w mleku surowym (w liczbie od 0,3 do 2,8 log jtk/ml, w zależności od warunków doju) oraz w środowisku pozyskiwania mleka (gleba, kał krów, pasze, powierzchnia strzyków i wymion krów, powierzchnia kubków udojowych), a także w produktach mlecznych. Izolaty *B. cereus* były znacznie zróżnicowane w zakresie m.in. zdolności psychrotrofowych: odsetek szczepów zdolnych do rozwoju w temperaturze ok. 7°C wśród szczepów wyizolowanych z mleka surowego i produktów mlecznych wynosił 12-25%, natomiast wśród szczepów środowiskowych - tylko 3-7%. Podobne zróżnicowanie stwierdziłam w przypadku zdolności tworzenia toksyny HBL: wśród szczepów pochodzących z produktów mlecznych enterotoksynę wytwarzało 70-90%, a wśród szczepów środowiskowych - 41%. Stwierdziłam, że w mleku surowym, środowisku jego

pozyskiwania i w produktach mlecznych występują szczepy *B. cereus* zdolne do rozwoju w mleku przetrzymywanym w temperaturze 4°C. Wykazałam, że najwyższa dopuszczalna w Polsce temperatura przechowywania mleka spożywczego pasteryzowanego, czyli 6°C, nie gwarantuje zahamowania wzrostu psychrotrofowych szczepów *B. cereus*. W badaniach poświęconych przeżywalności *B. cereus* w warunkach symulujących pasaż żołądkowy stwierdziłam, że, w zależności od rodzaju pokarmu obecnego w pożywce oraz pH, od 4,5 do 85% komórek wegetatywnych *B. cereus* może przeżyć pasaż żołądkowy, co dowodzi, że oprócz przetrwalników również i komórki wegetatywne mogą przejść barierę, jaką stanowi żołądek, i wywołać zatrucie pokarmowe.

W badaniach, dotyczących aspektów technologicznych produkcji serów typu holenderskiego, stwierdzono, że zastosowanie dodatkowego startera bakterii mlekowych poddanego obróbce termicznej w warunkach 50-80°C / 10-30 minut korzystnie wpływało na cechy jakościowe serów o obniżonej zawartości tłuszczu, m.in. intensyfikowało proteolizę oraz procesy peptydolityczne, a dzięki temu zmniejszało twardość serów oraz ograniczało gorzknienie, co jest ich częstą wadą. Zastosowanie dodatkowego startera poddanego obróbce termicznej może być także sposobem na przyspieszenie dojrzewania serów podpuszczkowych dojrzewających i tym samym skrócenie tego etapu produkcji.

Aktualnie realizowane przeze mnie zagadnienia badawcze dotyczą wykorzystania potencjału bakterii octowych do zagospodarowania różnych produktów odpadowych (np. glicerolu odpadowego i serwatki kwaśnej/podpuszczkowej) oraz możliwości wykorzystania dodatkowych starterów bakterii mlekowych do zwiększania zawartości substancji aktywnych biologicznie, np. bioaktywnych peptydów i ograniczania powstawania niekorzystnych amin biogennych w serach podpuszczkowych dojrzewających.

Mój dotychczasowy dorobek naukowy przedstawiłam w Tabeli 1 i 2.

**Tabela 1. Liczbowe zestawienie dorobku naukowego**

<b>Publikacje (z uwzględnieniem prac wykazanych jako osiągnięcie naukowe)</b>									
Kategoria	Przed doktoratem			Po doktoracie			Łącznie		
	liczba	IF <sup>1</sup>	MNiSW <sup>2</sup>	liczba	IF <sup>1</sup>	MNiSW <sup>2</sup>	liczba	IF <sup>1</sup>	MNiSW <sup>2</sup>
Oryginalne prace twórcze z IF	-	-	-	8	17,604	220	8	17,604	220
Oryginalne prace twórcze bez IF	4	-	9	20	-	165	24	-	174
Publikacje przeglądowe z IF	-	-	-	2	2,242	35	2	2,242	35
Publikacje przeglądowe bez IF	-	-	-	15	-	118	15	-	118
Rozdziały w monografiach	-	-	-	1	-	4	1	-	4
Razem publikacje	4	-	9	46	19,846	542	50	19,846	551
<b>Patenty, komunikaty konferencyjne, inne</b>									
Patenty	-	-	-	1	-	25	1	-	25
Postery	15	-	-	38	-	-	53	-	-
komunikaty ustne (referaty)	-	-	-	4	-	-	4	-	-
sekwencje DNA zdeponowane w GenBank	-	-	-	1	-	-	1	-	-
udział w projektach badawczych i badawczo-rozwojowych	1	-	-	3	-	-	4	-	-
artykuły popularno-naukowe	2	-	-	7	-	-	9	-	-
Razem	18	-	-	54	-	-	72	-	25
<b>ŁĄCZNIE</b>									<b>576</b>

Tabela 2. Zestawienie prac twórczych

l.p.	nazwa czasopisma	liczba publikacji	IF	punkty wg. MNiSW	numer publikacji
<b>przed doktorem</b>					
1	Przemysł Spożywczy (1999)	2	-	2 x 2	IID1, IID2
	(2001)	1	-	2	IID4
2	Żywność. Nauka. Technologia. Jakość (2001)	1	-	3	IID3
3	Doniesienia zgłoszone na konferencjach krajowych	15	-	-	wymienione w załączniku 4, pkt III B
4	Artykuły popularno-naukowe	2	-	-	wymienione w załączniku 4, pkt III I
<b>Razem przed doktorem</b>			-	<b>9</b>	
<b>po doktoracie</b>					
1	Żywność. Nauka. Technologia. Jakość (2002)	1	-	3	IID5
	(2003)	3	-	3 x 3	IID7, IID8, IID9
	(2006)	1	-	4	IID12
	(2015)	2	-	2 x 13	IID34, IID35
2	Polish Journal of Natural Sciences (2002)	1	-	2	IID6
3	Medycyna Weterynaryjna (2004)	2	-	2 x 15	IID10, IID11
	(2007)	2	-	2 x 10	IID14, IID15
	(2008)	4	-	4 x 10	IID16, IID17, IID18, IID19
	(2009)	1	-	6	IID23
	(2010)	1	-	9	H2
	(2011)	3	-	3 x 10	IID27, IID28, IID29
(2014)	1	0,218	15	IIA1	
4	Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego (2007)	1	-	4	IID13
	(2008)	2	-	2 x 4	IID20, IID21
	(2009)	1	-	4	IID24
	(2010)	1	-	6	IID26
	(2013)	1	-	4	IID32
5	Przemysł Spożywczy (2010)	1	-	6	IID25
	(2012)	2	-	2 x 6	IID30, IID31
	(2018)	1	-	12	IID36
6	Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych (2013)	1	-	9	IID33
	(2018)	3	-	3 x 13	H1, IID37, IID38
7	Microbial Pathogenesis (2015)	1	1,888	20	IIA2
8	Applied Biochemistry and Biotechnology (2015)	1	1,606	20	IIA3
9	Food Microbiology (2015)	1	3,682	35	H3
	(2017)	1	4,090	35	H4
10	LWT - Food Science and Technology (2016)	1	2,711	35	IIA4
11	European Food Research and Technology (2018)	1	1,919	30	H5
12	Applied Sciences			2 x 25	



	(2018) (2019)	2	2 x 1,689		IIA5 IIA6
13	Postępy Mikrobiologii (2019)	1	0,354	15	IIA7
14	Patenty (2015)	1	-	25	IIB1
15	Rozdziały w monografiach (2008)	1	-	4	IID22
16	Referaty wygłoszone na konferencjach krajowych i międzynarodowych	4	-	-	wymienione w załączniku 4, pkt II K
17	Doniesienia zgłoszone na konferencjach międzynarodowych	11	-	-	wymienione w załączniku 4, pkt III B
18	Doniesienia zgłoszone na konferencjach krajowych	27	-	-	wymienione w załączniku 4, pkt III B
19	Artykuły popularno-naukowe	7	-	-	wymienione w załączniku 4, pkt III I
<b>Razem po doktoracie</b>			<b>19,846</b>	<b>567</b>	
<b>Razem</b>			<b>19,846</b>	<b>576</b>	

- po wyłączeniu 5 prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe (IF=9,691, 122 pkt. MNiSW), wartość mojego pozostałego dorobku naukowego osiąga IF=10,155 i 454 pkt. MNiSW, z czego dla prac opublikowanych po doktoracie IF=10,155, liczba punktów MNiSW – 445.
- Index Hirscha wg Web of Science - 3
- *h*-index wg Scopus - 4
- liczba cytowań na podstawie Web of Science - 56 (z pominięciem autocytowań – 53)
- liczba cytowań na podstawie Scopus - 62.

## 7. Inne osiągnięcia związane z aktywnością dydaktyczną i organizacyjną

### 7.1. Działalność dydaktyczna

Szczegółowy opis zrealizowanych przeze mnie zadań dydaktycznych zamieściłam w Załączniku 4, pkt III I-J. W SGGW w Warszawie, na Wydziale Nauk o Żywności, w Zakładzie Biotechnologii Mleka, w którym nadal pracuję, zatrudniona zostałam 1 września 1996 r. Pracę doktorską wykonywałam jako asystent, równoległe zajmując się działalnością dydaktyczną i organizacyjną. W ramach pracy na stanowisku asystenta, a następnie jako adiunkt, prowadziłam zajęcia dydaktyczne ze studentami I i II stopnia trybu stacjonarnego, niestacjonarnego i wieczorowego kierunku *technologia żywności i żywienie człowieka* na Wydziale Nauk o Żywności (WNoŻ), a także na kierunku *bezpieczeństwo żywności* oraz *towaroznawstwo*, realizowanych również na moim macierzystym Wydziale. Zajęcia dydaktyczne z zakresu podstaw przetwórstwa mleka prowadziłam również dla studentów

studiów stacjonarnych i niestacjonarnych I i II stopnia kierunku *zootechnika*, realizowanego na Wydziale Nauk o Zwierzętach SGGW w Warszawie. Od 2013 r. jestem wykładowcą na Studiach Podyplomowych "*Higiena Zwierząt Rzeźnych i Żywności Pochodzenia Zwierzęcego*" na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie, a wykłady dotyczą mikrobiologii mleka surowego oraz aspektów jakości mikrobiologicznej produktów mlecznych.

Jestem autorem lub współautorem programów licznych przedmiotów, które obecnie również realizuję. Są to wykłady (w) i ćwiczenia (ć) prowadzone na Wydziale Nauk o Żywności SGGW dla studentów kierunku *technologia żywności i żywienie człowieka* z następujących przedmiotów: Propedeutyka przemysłu spożywczego (ć), Ogólna technologia żywności (ć), Kierunkowe technologie żywności - Technologia mleka (ć), Technologia Mleka (w, ć), Towaroznawstwo surowców i produktów przemysłu spożywczego (w), Polityka wyżywienia ludności (w), Bakterie mlekowe w technologii żywności (w), Współczesne trendy w nauce o żywności i żywieniu - produkty zwierzęce (w, ć), Współczesne technologie (w, ć), Technologia specjalizacyjna (technologia mleka) (w, ć), Postępy w analizie żywności (w, ć), Seminarium dyplomowe (ć), Konwersatorium dyplomowe (ć), Podstawy metodologii badań doświadczalnych (ć), Podstawy opracowywania wyników badań naukowych (ć), kierunku *bezpieczeństwo żywności* z przedmiotu: Technologia i higiena żywności pochodzenia zwierzęcego (w, ć) i kierunku *towaroznawstwo* z przedmiotu: Ogólna technologia żywności (ć). Liczba zrealizowanych przeze mnie godzin dydaktycznych w każdym roku pracy wynosiła średnio około 300.

Od 9 lat jestem koordynatorem przedmiotu Kultury starterowe w przemyśle spożywczym, realizowanego dla studentów studiów II stopnia kierunku *biotechnologia* na Wydziale Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu SGGW w Warszawie. Byłam współautorem koncepcji tego przedmiotu i opracowywałam obowiązujący sylabus. Prowadzę z tego przedmiotu zarówno wykłady, jak i ćwiczenia laboratoryjne.

Na kierunku *technologia żywności i żywienie człowieka* byłam promotorem 45 prac dyplomowych magisterskich oraz 55 prac inżynierskich, na kierunku *towaroznawstwo* - 3 prac inżynierskich i na kierunku *bezpieczeństwo żywności* - 1 pracy inżynierskiej. Wszystkie trzy kierunki realizowane są na Wydziale Nauk o Żywności SGGW w Warszawie. Również pod moim promotorstwem powstało 6 prac magisterskich na kierunku *biotechnologia* (dawniej Międzywydziałowe Studium Biotechnologii SGGW) na Wydziale Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu SGGW.

W latach 2010 - 2014 pełniłam funkcję opiekuna studentów studiów niestacjonarnych i wieczorowych kierunku *technologia żywności i żywienia człowieka* WNoŻ SGGW w Warszawie.

W ankietach przeprowadzanych corocznie moja praca dydaktyczna jest wysoko oceniana przez Studentów. Wysoko oceniana byłam także w czasie hospitacji prowadzonych przeze mnie zajęć wykładowych i ćwiczeniowych. JM Rektor SGGW w Warszawie 3-krotnie przyznał mi nagrody za działalność dydaktyczną.

Jestem współautorem 5 rozdziałów w skryptach i podręcznikach akademickich, m.in. rozdziału "Analiza fizykochemiczna i higieniczna mleka surowego" w "Wybrane zagadnienia z technologii żywności", pod red. M. Mitek i M. Słowiński, wyd. SGGW Warszawa, rozdziału pt: "Wirowanie i homogenizacja" w "Ogólna Technologia Żywności", pod red. E. Dłużewska i K. Leszczyński, wyd. SGGW Warszawa, oraz trzech rozdziałów w podręczniku "Wybrane Zagadnienia z Technologii Żywności Pochodzenia Zwierzęcego", pod red. M. Słowińskiego, wyd. SGGW Warszawa (Ocena mleka surowego i technologia mleka spożywczego, Technologia serów podpuszczkowych i twarogowych, Technologia serów topionych).

Jestem także współautorem rozdziału "Przetwórstwo Mleka" w podręczniku dla uczniów szkół średnich pt. "Technologia Żywności. Kierunkowe Technologie. Część II" pod red. E. Czarneckiej-Skubiny, wyd. Format AB Warszawa oraz rozdziału "Wybrane metody przetwarzania mleka" w monografii wydanej przez Centrum Doradztwa Rolniczego w Brwinowie, Oddział w Radomiu pt: "Przetwórstwo Mleka na Poziomie Gospodarstwa", przeznaczonej dla hodowców bydła mlecznego.

Ponadto, aktywnie uczestniczyłam w różnych wydarzeniach promujących naukę prowadziłam otwarte wykłady w ramach: „Wszechnicy Żywnościowej w SGGW” (wykład pt. „Sery – czy wiesz co jesz”) oraz XVIII i XIX Festiwalu Nauki (wykłady pt. "Dobre zdrowie z serem"). Jestem jednym z wielu współautorów "Leksykonu Nauki o Żywności i Żywieniu Człowieka oraz Polsko-Angielskiego Słownika Terminów" pod redakcją Prof dr hab P.P. Lewickiego (autorstwo ok. 200 haseł z zakresu technologii mleka) oraz jednej z serii broszur popularno-naukowych promujących wiedzę o wartości żywnościowej mleka i produktów mlecznych (pt.: "Napoje mleczne ... pysznie i zdrowo"), wydanej przez Związek Prywatnych Przetwórców Mleka, a dofinansowanej z Funduszu Promocji Mleczarstwa. Brałam aktywny udział w wydarzeniach promujących nauki ściśle wśród młodzieży, np. recenzowałam prace zgłoszone na Polskie Eliminacje Konkursu Prac Młodych Naukowców Unii Europejskiej w 2014 r. oraz byłam jurorem na XLI Przeglądzie Dorobku Kół Naukowych SGGW w Sekcji Żywnienie i technologia żywności (2014 r.).

Swoje umiejętności dydaktyczne doskonaliłam, uczestnicząc w kursach, szkoleniach i warsztatach. Do najważniejszych należy zaliczyć ukończenie Podyplomowego Studium Pedagogicznego SGGW w 2003 r. oraz dwóch edycji Letnich Szkół z cyklu "*Bakterie fermentacji*

*mlekowej - klasyfikacja, metabolizm, genetyka, wykorzystanie*", które odbyły się w 1998 i 2003 r. Odbyłam także szkolenie w zakresie wykorzystania programu Statistica w naukach biologicznych w 2004 r. oraz szkolenie z zakresu systemów zarządzania jakością w przemyśle spożywczym w 2008 r.

## 7.2. Działalność organizacyjna

Obok działalności naukowej i dydaktycznej istotnym elementem mojej aktywności zawodowej jest działalność organizacyjna. Za najważniejsze osiągnięcie w tym zakresie, wpisujące się także w działalność o charakterze edukacyjnym, uważam pozyskanie funduszy w ramach dwóch projektów finansowanych przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, w ramach Działania 3.1 „Kompetencje w szkolnictwie wyższym” w Oś III POK II „Ścieżki Kopernika” (nr projektu WND-POWR.03.01.00-00-C080/16, *"Obóz Naukowy Adamed SmartUp w SGGW"*) oraz "Trzecia Misja Uczelni" (nr projektu nr projektu WND-POWR.03.01.00-00-T023/18-01, *"Innowacyjny Obóz Naukowy SmartUp"*). Pierwszy z tych projektów był realizowany w okresie od 01.10.2016 r. do 30.09.2018 r., a kwota dofinansowania opiewała na około 230 tys. PLN. Drugi projekt, dofinansowany na poziomie około 730 tys. PLN, rozpoczął się 01.09.2018 r., a zakończy 31.10.2020 r. W przypadku obu projektów, jestem współautorem wniosków o dofinansowanie, pełniłam/ę rolę kierownika projektu, ale także byłam jednym z wykładowców prowadzących zajęcia z młodzieżą. Celem obu tych projektów jest podniesienie i rozwój, wśród uzdolnionej młodzieży (w wieku 15-19 lat), kompetencji pozwalających na poszerzenie wiedzy specjalistycznej z zakresu pasjonujących ich dziedzin nauk ścisłych i przyrodniczych, rozwój zainteresowań uczestników Projektu oraz pobudzenie ich aktywności edukacyjnej i kulturalnej. Powyższy cel realizowany jest przez organizację 2-tygodniowych Obozów Naukowych, na których uczestnicy mają możliwość udziału w zajęciach teoretycznych i praktycznych, które pozwolą im na rozwój wiedzy i budowanie kompetencji kluczowych, niezbędnych na kolejnych etapach edukacji. Podczas każdego Obozu uczestnicy podzieleni są na 4 grupy w ramach ścieżek edukacyjnych z zakresu: medycyny i nauk medycznych, chemii i biochemii, robotyki i programowania oraz fizyki i nowych technologii. Zajęcia prowadzą wykładowcy z najlepszych uczelni w Polsce (m.in. SGGW w Warszawie, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego i Politechniki Warszawskiej) oraz z Europy (Cambridge University, Oxford University, University College London, Imperial College London, University of Edynburgh).

Prowadziłam także zajęcia z podstaw technologii mleczarskiej dla młodzieży w ramach Projektu Edukacyjnego pt: *"Rozwój kompetencji zawodowych uczniów Technikum*

kształcących się w zawodach: technik obsługi turystycznej, technik mechanik, technik mechatronik, technik technologii żywności, technik hotelarstwa w Zespole Szkół Ponadgimnazjalnych nr 1 w Opocznie we współpracy z przedsiębiorcami" (nr projektu RPLD.11.03.01-10-0047/16-00), współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Łódzkiego na lata 2014 - 2020.

Wielokrotnie uczestniczyłam w pracach Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej oraz w działaniach mających na celu promocję Wydziału Nauk o Żywności oraz mojej macierzystej Uczelni na przykład w czasie Międzynarodowych Targów FOOD-EXPO, czy Dni SGGW (początkowo jako Pełnomocnik Dziekana WNoŻ SGGW ds. Dni SGGW, a następnie jako Prodziekan ds. dydaktyki i promocji).

Od 2016 r. pełnię funkcję Prodziekana ds. dydaktyki i promocji Wydziału Nauk o Żywności SGGW w Warszawie.

### **7.3. Działalność w towarzystwach naukowych i zespołach eksperckich**

Od momentu zatrudnienia w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności. Od 2018 r. jestem członkiem American Society for Microbiology. W 2018 r. zostałam powołana na członka Komitetu Technicznego (KT) nr 35 ds. Mleka i Produktów Mleczarskich Polskiego Komitetu Normalizacyjnego. Aktywnie uczestniczę w pracach KT, wykonuję tłumaczenia i weryfikacje tłumaczeń z języka angielskiego aktów normatywnych ISO, dotyczących analizy mikrobiologicznej i fizyko-chemicznej produktów mleczarskich.

### **7.4. Otrzymane nagrody i wyróżnienia**

W czasie pracy w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie otrzymałam 3 Nagrody Rektora SGGW w Warszawie Zespołowe Stopnia I za osiągnięcia dydaktyczne (w 2007, 2014 i 2015 r.), a w 2017 r. odznaczenie nadane przez Prezydenta RP, za całokształt działalności na rzecz uczelni – Medal Srebrny za Długoletnią Służbę.

### **7.5. Współpraca z ośrodkami naukowymi polskimi i zagranicznymi, recenzje publikacji**

Od 2016 r. współpracuję z dr Iloną Stefańską z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie w ramach badań nad identyfikacją genetyczną izolatów *Cronobacter* spp. na podstawie sekwencjonowania 16S rDNA, analizy PCR-RFLP i analizy RAPD-PCR, co zaowocowało publikacją H4, ujętą w głównym osiągnięciu naukowym. W 2017 r., po ukazaniu się publikacji H4, nawiązałam współpracę naukową z wybitnym specjalistą z zakresu systematyki, charakterystyki fenotypowej i genetycznej



oraz patogenności bakterii należących do rodzaju *Cronobacter*, prof. Stephenem J. Forsythe'em i dr Pauline Ogrodzki z School of Science and Technology w Nottingham Trent University (UK). W ramach tej współpracy potwierdzona została metodą MLST prawidłowa klasyfikacja szczepu *Cronobacter* s37, wyizolowanego z kiełków rzodkiewki do gatunku *Cronobacter condimenti*. Wyizolowany przez mnie szczep *Cronobacter condimenti* s37 jest drugim wyizolowanym na świecie szczepem z tego gatunku. Dzięki współpracy z Prof. S. Forsythe'em i dr P. Ogrodzki, a także z dr Tamarą Aleksandrak-Piekarczyk z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, szczep umieszczono w bazie *Cronobacter* PubMLST pod numerem ID 1896, a następnie w DDBJ/ENA/GenBank pod numerem akcesyjnym RQEO01000001-RQEO01000043.

Od 2018 r. współpracuję z dr Pritamem Kumarem Dikshitem z ośrodka naukowego The Energy and Resources Institute w New Delhi w Indiach w ramach prac badawczych nad wykorzystaniem *Gluconobacter oxydans* do biotransformacji glicerolu odpadowego do dihydroksyacetonu (DHA), których wyniki opublikowano w publikacji IIA5 (załącznik 4).

Wykonałam ponadto 20 recenzji publikacji naukowych dla takich polskich czasopism jak: Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, Bulletin of the Veterinary Institute of Pulawy oraz Acta Scientiarum Polonorum-Technologia Alimentaria, a także następujących czasopism zagranicznych: Journal of Dairy Science, Food Microbiology, Scientific Reports, Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, African Journal of Biotechnology, Journal of Microbiology and Antimicrobials, Focusing on Modern Food Industry, African Journal of Food Science, Toxins (MDPI), Molecules (MDPI), Foods (MDPI) oraz Tropical Medicine and Infectious Disease (MDPI).

## 7.6. Współpraca z przemysłem

Obok aktywności naukowej i dydaktycznej realizuję się również, współpracując z podmiotami gospodarczymi. W moim dorobku jest pięć ekspertyz/opracowań wykonanych na zamówienie podmiotów zewnętrznych (załącznik 4: IIIM).

W roku 2009 współpracowałam z Zakładami Przemysłu Tłuszczowego „Kruszwica” S.A. w Kruszwicy w zakresie wykonania ekspertyzy, dotyczącej jakości mikrobiologicznej surowców/produktów, ze szczególnym uwzględnieniem zanieczyszczenia bakteriami z gatunku *Bacillus cereus* wraz z określeniem ewentualnej toksyczności wyizolowanych szczepów *B. cereus sensu lato*.

W 2009 r. zrealizowałam zlecone przez Instytut Przemysłu Organicznego w Warszawie „Badania mikrobiologiczne działania bromfenwinfosu i jego trzech zanieczyszczeń przeciwko dwunastu szczepom drobnoustrojów stosowanych w przemyśle spożywczym”. Badania dotyczyły określenia wpływu bromfenwinfosu i jego zanieczyszczeń, który jest substancją

czynną leków weterynaryjnych przeciwko warrozie u pszczoł oraz zakażeniom pasożytniczym u zwierząt hodowlanych, na drobnoustroje celowo stosowane w przemyśle spożywczym, takie jak bakterie kwasu mlekowego oraz drożdże z gatunku *Saccharomyces cerevisiae*. Wykonane przeze mnie badania stanowiły część badań wykonanych w ramach projektu celowego nr 6 ZR7 2007/C06895 pt: *"Uruchomienie produkcji substancji aktywnej - bromfenwinfos w Instytucie Przemysłu Organicznego i uruchomienie produkcji weterynaryjnego środka leczniczego do zwalczania warrozy u pszczoł w Biowet-Puławy"*. Byłam odpowiedzialna za zaplanowanie eksperymentów, wykonanie większości badań i przygotowanie raportu dla zleceniodawcy. Raport ten był częścią wniosku o rejestrację weterynaryjnego środka leczniczego (zawierającego jako substancję aktywną - bromfenwinfos) w European Medicines Agency (EMA) w Londynie.

Współpracowałam z firmą ENBIO TECHNOLOGY Sp z o.o. oraz ROBICO w Warszawie w ramach dwóch zleceń na temat możliwości wykorzystania sterylizatora mikrofalowego do sterylizacji śmietanki i retentatu po mikrofiltracji mleka, które zaowocowały publikacją oraz doniesieniem konferencyjnym z tego zakresu (Załącznik 4: IID25 i IIIB34, odpowiednio). W przypadku obu tych opracowań byłam odpowiedzialna za wykonanie badań mikrobiologicznych oraz współtworzyłam ekspertyzy.

W 2015 r. współpracowałam z firmą POLDER Sp. z o.o. w ramach realizacji tzw. Małego Bonu pt: *"Opracowanie nowych produktów wraz z wdrożeniem ich do produkcji"*. Brałam udział w opracowaniu nowej technologii produkcji kremów mlecznych typu "kajmak", w tym kremów kajmakowych bezlaktozowych. Byłam odpowiedzialna za wykonanie badań jakości i trwałości otrzymanych według opracowanej technologii produktów oraz przygotowanie raportów z wykonanych badań.

Znaczna część działań podjętych przeze mnie w ramach współpracy z przemysłem skupiała się na aktywności szkoleniowej (załącznik 4: IIIQ1) z zakresu mikrobiologii, technologii oraz oceny jakości mleka i produktów mlecznych. Byłam współautorem materiałów szkoleniowych i wykładowcą na szkoleniach dla członków Związku Prywatnych Przetwórców Mleka, Krajowego Stowarzyszenia Mleczarzy, pracowników firmy JARS Sp. z o.o. w Legionowie, INTERFOOD Sp. z o.o. w Warszawie, Spółdzielni Mleczarskiej w Koninie, Spółdzielni Mleczarskiej w Łasku, a także specjalistów z zakładów mleczarskich z Białorusi.

Wraz z zespołem Zakładu Biotechnologii Mleka opracowałam koncepcję i materiały na warsztaty dla dziennikarzy, zajmujących się zagadnieniami związanymi ze zdrowym odżywianiem i uświadamianiem na tym polu konsumentów. Warsztaty pt: *„Odpowiedzialny producent i świadomy konsument, czyli co powinniśmy wiedzieć przed zakupem*

produktów żywnościowych” organizowane były na zlecenie firmy Danone Sp. z o.o. W 2007 r. organizowałam także wykłady i zajęcia praktyczne pt: „Metody określania objętości lodów” dla pracowników Głównego Urzędu Miar (załącznik 4: IIIQ1).

### 7.7. Osiągnięcia w zakresie popularyzacji nauki

W celu popularyzacji wiedzy o współczesnych trendach w technologii mleka publikowałam w czasopismach branżowych, głównie sektora mleczarskiego, takich jak Przegląd Mleczarski i Forum Mleczarskie oraz w innych periodykach o tematyce związanej z jakością i technologią mleka (np. Chów Bydła, czy Bezpieczeństwo i Higiena Żywności). Do tej pory ukazało się dziewięć artykułów popularno-naukowych z moim współautorstwem. Szczegółowy ich spis zamieściłam w Załączniku 4: III I6.

*Berthold-Pluta*