Lublin, 01.09.2026 r.

Prof. dr hab. Magdalena Polak-Berecka
Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii
i Żywienia Człowieka
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pt.: **„Wpływ technologii wysokich ciśnień (HPP) na zmiany w wirulencji i antybiotykooporności szczepów *Listeria monocytogenes* izolowanych z żywności i środowiska jej produkcji”**
wykonanej przez **mgr inż. Patryka Wiśniewskiego** w Katedrze Mikrobiologii Żywności, Technologii i Chemii Mięsa UWM w Olsztynie
pod kierunkiem **dr hab. inż. Anny Zadernowskiej, prof. UWM**, oraz promotora pomocniczego **dr hab. inż. Wiolety Chajęckiej-Wierzchowskiej, prof. UWM**

Podstawę formalną realizacji recenzji stanowi Uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia UWM Nr 3/2026 podpisana przez Panią przewodniczącą, prof. dr hab. Annę Iwaniak (z dnia 26.06.2026) oraz rozprawa doktorska mgr inż. Patryka Wiśniewskiego.

Podstawę prawną stanowi art. 190 ust. 2 oraz 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 r. poz. 1571 ze zm).

I. Ocena formalna rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pt.: „Wpływ technologii wysokich ciśnień (HPP) na zmiany w wirulencji i antybiotykooporności szczepów *Listeria monocytogenes* izolowanych z żywności i środowiska jej produkcji” stanowi cykl spójnych tematycznie pięciu publikacji, w tym trzech oryginalnych prac twórczych i dwóch prac przeglądowych, opublikowanych w latach 2022-2026 w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym wymienionych w wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW):

P1. Wiśniewski, P., Zakrzewski, A. J., Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W. (2022). Antimicrobial Resistance and Virulence Characterization of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Food and Food Processing Environments. *Pathogens*, 11, 1099. https://doi.org/10.3390/pathogens11101099.

P2. Wiśniewski, P., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2023). High-Pressure Processing – Impacts on the Virulence and Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolated from Food and Food Processing Environments. *Foods*, 12, 3899. https://doi.org/10.3390/foods12213899.

P3. Wiśniewski, P., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2024). High-Pressure Processing Influences Antibiotic Resistance Gene Transfer in *Listeria monocytogenes* Isolated from Food and Processing Environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 25, 12964. https://doi.org/10.3390/ijms252312964.

P4. Wiśniewski, P., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2024). Impact of High-Pressure Processing (HPP) on *Listeria monocytogenes* – An Overview of Challenges and Responses. *Foods*, 13, 14. https://doi.org/10.3390/foods13010014.

P5. Wiśniewski, P., Zadernowska, A. (2026). Application of pascalisation in the control of *Listeria* sp. in beverages – Effectiveness, limitations, and future prospects. *Food Microbiology*,134, 104932. https://doi.org/10.1016/j.fm.2025.104932.

Sumaryczna liczba punktów MNiSW za cykl prac stanowiących przedmiot rozprawy wynosi 580, a sumaryczny Impact Factor (zgodnie z rokiem opublikowania) 23. **Należy podkreślić, że we wszystkich pracach Doktorant jest pierwszym autorem, a w czterech pełnił rolę autora korespondencyjnego. Zgodnie z oświadczeniami pozostałych członków zespołu badawczego udział Doktoranta w powstawaniu prac był wiodący** i polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich dyskusji na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekcie artykułu i odpowiedzi na recenzje. Zamieszczono również informację na temat finansowania badań wykonanych w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej (NCN, OPUS 15, nr 2018/29/B/NZ9/00645, PRELUDIUM 23, nr 2024/53/N/NZ9/00833) oraz sfinansowanie jednej publikacji z projektu RID nr 010/RID/2018/19.

Ocena układu i struktury rozprawy

Dysertacja podzielona jest na 10 rozdziałów, znajdujących się w logicznym układzie typowym dla naukowych prac badawczych. W części teoretycznej Doktorant zawarł Wykaz skrótów, Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz Wstęp, w którym jasno przedstawił przedmiot i zakres badań oraz uzasadnił wybór tematu. W kolejnych rozdziałach znajduje się Cel badań i Hipotezy badawcze. W części metodycznej, w rozdziale Organizacja badań Doktorant w uporządkowany i logiczny sposób, przedstawił etapy realizacji poszczególnych prac eksperymentalnych, a w rozdziale Materiały i metody badań opisał zastosowaną metodologię i techniki badawcze. W rozdziale Wyniki Doktorant przedstawił dane uzyskane w toku przeprowadzonych badań. Tabele oraz ryciny zostały opracowane w sposób czytelny i zgodny z zasadami prezentacji danych naukowych. Ich dobór jest uzasadniony merytorycznie, a zamieszczone elementy graficzne stanowią wartościowe uzupełnienie opisu wyników badań.

Uzyskane wyniki zostały przedstawione w sposób uporządkowany, przejrzysty i umożliwiający ich właściwą interpretację. Doktorant przedstawił omówienie i podsumowanie uzyskanych wyników w rozdziałach Dyskusja oraz Wnioski i stwierdzenia końcowe. Dalej zawarł rozdział przedstawiający Spis tabel i rycin oraz Literatura obejmująca 162 pozycje bibliograficzne. Dobór wykorzystanego piśmiennictwa oceniam wysoko. Autor zgromadził obszerny i dobrze dobrany materiał źródłowy, odpowiadający zakresowi oraz celom prowadzonych badań. W Dysertacji Doktorant zamieścił także Całkowite zestawienie dorobku naukowego oraz Załączniki, na które składa się pięć publikacji (stanowiących spójny tematycznie cykl) wraz z Oświadczeniami autora i współautorów o udziale w opracowaniu publikacji.

Ocena strony edytorskiej

Proporcje poszczególnych części rozprawy doktorskiej oraz przejrzystość prezentowanych treści oceniam jako właściwe. Rozprawa doktorska została przygotowana z należytą starannością pod względem edytorskim. Tekst charakteryzuje się wysoką poprawnością językową oraz stylistyczną, a zastosowana terminologia naukowa jest właściwa dla dyscypliny technologia żywności i żywienia i stosowana konsekwentnie w całej pracy. Konstrukcja rozprawy jest przejrzysta i logiczna, co ułatwia odbiór prezentowanych treści. Cytowanie literatury oraz sporządzenie wykazu piśmiennictwa nie budzą zastrzeżeń i są zgodne z powszechnie przyjętymi standardami obowiązującymi w publikacjach naukowych.

II. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Ocena wyboru tematyki badawczej

Podjętą w rozprawie problematykę wpływu technologii wysokich ciśnień (ang. High-Pressure Processing, HPP) na właściwości biologiczne izolowanych z żywności szczepów *Listeria monocytogenes* należy uznać za w pełni zasadną, aktualną oraz istotną z punktu widzenia zarówno nauk podstawowych, jak i bezpieczeństwa żywności. Technologia HPP jest coraz szerzej stosowaną metodą nietermicznego utrwalania żywności, umożliwiającą ograniczenie liczby mikroorganizmów patogennych przy jednoczesnym zachowaniu cech sensorycznych i jakościowych produktów. *Listeria monocytogenes* należy do najważniejszych patogenów związanych z żywnością i środowiskiem jej produkcji, w szczególności serotypy 1/2a, 1/2b, 1/2c i 4b. Zdolność tego patogenu do przetrwania stresów środowiskowych i procesów technologicznych sprawia, że stanowi szczególne wyzwanie dla przemysłu spożywczego. Zmienność międzyszczepowa *L. monocytogenes* w zakresie cech genetycznych i fenotypowych, obejmująca m.in. potencjał wirulencji, barotolerancję oraz obecność genów związanych z opornością, stanowi istotny czynnik wpływający na ocenę bezpieczeństwa żywności w kontekście stosowania nowoczesnych technologii jej przetwarzania.

Szczególnie istotnym aspektem jest fakt, że efekt HPP nie ogranicza się wyłącznie do inaktywacji komórek, lecz może również modyfikować ich fizjologię, odpowiedź stresową oraz ekspresję genów związanych z wirulencją. Już wcześniejsze badania transkryptomiczne wykazały, że pod wpływem HPP dochodzi u *L. monocytogenes* do istotnych zmian ekspresji genów, w tym genów regulowanych przez białka SigB i PrfA oraz genów związanych z wirulencją. Jednocześnie odpowiedź bakterii jest zależna szczepu oraz od intensywności zastosowanego ciśnienia i czasu jego działania. W literaturze opisano zarówno zwiększenie, jak i ograniczenie ekspresji wybranych genów związanych z wirulencją, co wskazuje na złożoność odpowiedzi tego patogenu na stres wysokociśnieniowy.

Równie istotnym i aktualnym zagadnieniem jest możliwość modyfikowania przez HPP profilu antybiotykooporności *L. monocytogenes* oraz jej potencjału do horyzontalnego transferu genów. Najnowsze niezależne badania wykazały, że po zastosowaniu HPP mogą występować zmiany wartości MIC oraz ekspresji wybranych genów oporności na tetracyklinę, przy czym reakcja ta ma charakter szczepozależny.

Zasadność podjęcia badań wynika zatem nie tylko z rosnącego znaczenia technologii HPP w przemyśle spożywczym, lecz również z potrzeby pełniejszej oceny konsekwencji biologicznych przeżycia *L. monocytogenes* poddanego działaniu wysokiego ciśnienia. Szczególnie wartościowe jest połączenie oceny przeżywalności bakterii z analizą zmian dotyczących wirulencji i antybiotykooporności, ponieważ pozwala na bardziej kompleksową ocenę bezpieczeństwa technologicznego procesu. Dużą wartość poznawczą wnoszą badania nad potencjałem *L. monocytogenes* poddanych stresowi HPP do transferu genów oporności na antybiotyki.

Dotychczasowe wyniki badań wskazują, że HPP, mimo wysokiej skuteczności w ograniczaniu liczebności *L. monocytogenes*, może wywoływać u komórek, które przetrwały proces, złożoną odpowiedź adaptacyjną obejmującą zmiany ekspresji genów związanych z wirulencją, odpowiedzią stresową oraz antybiotykoopornością. Szczególnego znaczenia nabiera szczepozależność tych zmian oraz możliwość ich utrzymywania się po zakończeniu oddziaływania czynnika stresowego. Tym samym podjęta problematyka posiada zarówno istotną wartość poznawczą, jak i znaczenie aplikacyjne z punktu widzenia oceny bezpieczeństwa nowoczesnych technologii utrwalania żywności.

W rozdziale 1. Wstęp – uzasadnienie podjęcia badań Doktorant przedstawił zagadnienia teoretyczne w oparciu o przegląd aktualnej literatury przedmiotu związanej z problematyką podjętą w pracy. Doktorant scharakteryzował gatunek *Listeria monocytogenes*, w szczególności pod względem cech wirulencji i antybiotykoodporności. Uwzględniając obowiązujące regulacje legislacyjne przedstawił zagrożenia dla bezpieczeństwa żywności związane z obecnością tego patogenu. W dalszej części Autor przedstawił technologię HPP w aspekcie technologicznym oraz wpływ stresu wysokiego ciśnienia na komórki bakterii. Doktorant zwrócił uwagę, że technologia HPP, mimo swojej udowodnionej skuteczności, nie jest pozbawiona ograniczeń, które mogą wpływać na końcowe bezpieczeństwo mikrobiologiczne produktu. Subletalne traktowanie z wykorzystaniem HPP może uruchamiać u *L. monocytogenes* złożone genetyczne mechanizmy odpowiedzi na stres, co może wpływać na ich patogenność oraz zmiany profilu antybiotykooporności. Wskazana przez Doktoranta luka w wiedzy dotyczy braku kompleksowego rozpoznania wpływu subletalnych warunków HPP na właściwości biologiczne *L. monocytogenes*, z uwzględnieniem zmienności międzyszczepowej. W szczególności niedostatecznie poznane pozostają zależności pomiędzy przeżyciem bakterii po ekspozycji na wysokie ciśnienie a

zmianami jej barotolerancji, potencjału wirulencji oraz profilu antybiotykoodporności i promowaniu transferu genów antybiotykooporności. Uzupełnienie tej wiedzy ma istotne znaczenie dla pełnej oceny bezpieczeństwa żywności poddawanej obróbce wysokociśnieniowej. Przedstawione we Wstępie zagadnienia teoretyczne zostały szczegółowo omówione w pracach przeglądowych P4 i P5. Na szczególną uwagę i pochwałę zasługuje publikacja P5 przygotowana w oparciu o metaanalizę danych literaturowych zgodnie z metodologią PRISMA (ang. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses). Zastosowanie tego podejścia zapewniło **systematyczny i transparentny sposób identyfikacji, selekcji oraz analizy dostępnych doniesień naukowych, a tym samym stworzyło solidne podstawy do wiarygodnej oceny aktualnego stanu wiedzy, identyfikacji najważniejszych prawidłowości i zależności oraz wskazania obszarów wymagających dalszych badań**.

W rozdziale 2. dysertacji **cel pracy został sformułowany w sposób jasny, precyzyjny i adekwatny do podjętej problematyki badawczej**. Odpowiada on aktualnemu stanowi wiedzy oraz uzasadnieniu podjęcia badań. Cele szczegółowe pozostają logicznie powiązane z celem głównym i tworzą spójną koncepcję badawczą.

Przedstawione w rozdziale 3. **hipotezy badawcze są trafnie sformułowane, logiczne i pozostają w bezpośrednim związku z przyjętymi celami pracy**. Ich konstrukcja umożliwia empiryczną weryfikację w oparciu o zastosowane metody badawcze i uzyskane wyniki. Hipotezy uwzględniają specyfikę analizowanego problemu oraz pozwalają na kompleksową ocenę wpływu warunków stresowych generowanych przez zastosowanie HPP na możliwość przeżycia i odpowiedź komórkową szczepów *L. monocytogenes* wyizolowanych z żywności i środowiska jej produkcji. Nasuwa się tu jednak drobna uwaga, o charakterze dyskusyjnym:

Uwaga 1. Hipotezy H1 i H6 są silnie ze sobą powiązane i częściowo się nakładają**.** Hipoteza H1 jest bardzo szeroka, ma charakter ogólny i zakłada zależność efektu technologii wysokich ciśnień od parametrów procesu oraz właściwości matrycy żywnościowej, natomiast H6 stanowi jej bardziej szczegółowe rozwinięcie, koncentrujące się na modulującym wpływie matrycy na wybrane efekty HPP. W szczególności powtórzenie w obu hipotezach założenia dotyczącego wpływu matrycy na przeżywalność *L. monocytogenes* może budzić wątpliwości co do pełnej niezależności tych hipotez. Zasadne byłoby zatem wyraźniejsze rozgraniczenie zakresu obu hipotez albo potraktowanie H6 jako szczegółowego założenia wynikającego z hipotezy H1.

Ocena zastosowanych metod badawczych

W rozdziale 4. Organizacja badań Doktorant w syntetyczny i zrozumiały sposób wyjaśnił logikę przeprowadzonych eksperymentów i przedstawił koncepcję badań. Zastosowane w pracy zintegrowane podejście eksperymentalne, umożliwiło określenie zmian w zakresie przeżywalności, występowania genów oporności i wirulencji u badanych izolatów. Dalsze pogłębione analizy pozwoliły na ocenę ich odpowiedzi komórkowej i potencjału do horyzontalnego transferu genów w warunkach stresu wywołanego działaniem technologii HPP. Na pochwałę zasługuje schemat przedstawiający w zrozumiały i czytelny sposób poszczególne etapy realizacji badań z uwzględnieniem publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej.

Rozdział 5. stanowi opis Materiałów i metod badawczych wykorzystanych przez Doktoranta w zaprezentowanych publikacjach. Metodykę badań zastosowaną w pracy doktorskiej należy ocenić pozytywnie. Dobór metod badawczych jest zasadniczo właściwy i pozostaje w bezpośrednim związku z przyjętym celem pracy oraz sformułowanymi hipotezami badawczymi. Wykorzystanie metod mikrobiologicznych i molekularnych, służących ocenie zmian fenotypowych i funkcjonalnych stanowi właściwą podstawę do realizacji założonych celów badawczych. W pierwszej kolejności (P1) Doktorant dokonał potwierdzenia przynależności gatunkowej badanych izolatów posługując się metodami: MALDI-TOF MS oraz genotypowej metody PCR na obecność genów markerowych *prs* i *lmo1030*. W celu określenia serotypu izolatów Doktorant zastosował technikę Multiplex PCR, opisaną w literaturze przedmiotu i stosowaną do klasyfikacji szczepów *L. monocytogenes* do rożnych serotypów z linii I – najczęściej występujących w żywności i źródłach związanych z żywnością. W ramach wstępnych badań przesiewowych Doktorant metodami mikrobiologicznymi ocenił czynniki wirulencji (zdolność do produkcji śluzu i tworzenia biofilmu) 27 izolatów z żywności oraz 13 izolatów ze środowiska produkcji żywności. Wykorzystując technikę PCR analizował u wszystkich izolatów obecność genów wirulencji związanych z wyspą patogeniczności LIPI-1: *prfA*, *hly*, *sigB*, *luxS* i *InlB*. Dla wszystkich izolatów Doktorant przeprowadził skriningowe badania fenotypowe oporności na antybiotyki metodą dyfuzyjno-krążkową dla 12 antybiotyków, zgodnie ze standardami Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości (EUCAST, 2023) i Instytutem Norm Klinicznych i Laboratoryjnych (CLSI, 2020). Przy użyciu techniki PCR analizował obecność genów oporności na antybiotyki tj. *Lde* (cyprofloksacyna), *aadB* i *aac(3)-IIa (aacC2)* (gentamycyna), *penA* (penicylina G), *lnuA*, *lnuB* i *mefA* (klindamycyna/linkomycyna)

oraz *sulI* i *sulII* (trimetoprimu z sulfametoksazolem). Do dalszych pogłębionych analiz Doktorant wytypował 6 szczepów na podstawie ich przynależności do serotypów 1/2a lub 1/2c oraz wykazywania w badaniach skriningowych fenotypowej oporności (R) lub wrażliwości przy zwiększonej ekspozycji (I) wobec co najmniej jednego antybiotyku. W dalszych badaniach (P2), Doktorant metodą mikrorozcieńczeń, scharakteryzował wybrane szczepy pod względem oporności i wartości MIC dla 6 antybiotyków: trimetoprimu z sulfametoksazolem, tetracykliny, cyprofloksacyny, klindamycyny, linkomycynę i fosfomycyny. Każdy szczep został przeanalizowany metodą RT-PCR pod względem obecności genów oporności na antybiotyki oraz genów wirulencji. W dalszej części badań Doktorant analizował wpływ technologii HPP na odpowiedź komórkową *L. monocytogenes,* przy ciśnieniu 200 MPa oraz 400 MPa i czasie ekspozycji 5 minut. Metodą posiewów płytkowych ocenił przeżywalności i możliwość regeneracji badanych szczepów oraz zmiany profilu oporności na antybiotyki i zmiany w zdolności wytwarzania śluzu i tworzenia biofilmu. Posługując się metodą RT-qPCR Doktorant wykonał analizę ekspresji genów wirulencji i oporności na antybiotyki, stosując jako referencyjny gen kodujący 16S rRNA. W kolejnych badaniach (P3) Doktorant analizował wpływ technologii HPP na transfer genów oporności w warunkach *in vitro* i *in situ*. Jako biorcę wykorzystał standardowy szczep *Enterococcus faecalis* JH2-2 (LMG 19456), a transfer genów przeprowadził metodą filtrów membranowych. Dawcami były szczepy *L. monocytogenes* poddane obróbce HPP w pożywce mikrobiologicznej (200 MPa/5 min) oraz szczepy po regeneracji komórek po uprzedniej ekspozycji na ciśnienie 400 MPa/5 min. Donory niepoddane działaniu HPP stanowiły kontrolę. Transfer genów w warunkach *in situ* oceniano w matrycy żywnościowej, którą stanowił sok z marchwi. Transkoniuganty poddano analizie genotypowej z wykorzystaniem metody ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), umożliwiającej ich różnicowanie na podstawie profili amplifikacyjnych.

Na podkreślenie zasługuje **różnorodność i komplementarność zastosowanych metod**, które umożliwiły analizę zarówno na poziomie cech fenotypowych, jak i zmian zachodzących na poziomie molekularnym. Zasadniczo zastosowane procedury badawcze są poprawne metodologicznie, a ich dobór należy uznać za adekwatny do charakteru podjętego problemu naukowego. Metodyka badań została przedstawiona w sposób umożliwiający ocenę prawidłowości przeprowadzonych eksperymentów.

Pozytywnie należy również ocenić zastosowane metody analizy statystycznej. W

większości przypadków odpowiadają one charakterowi uzyskanych danych i umożliwiają obiektywną ocenę obserwowanych różnic oraz zależności. Zastosowanie odpowiednich testów statystycznych zwiększa wiarygodność wnioskowania i pozwala na właściwszą ocenę znaczenia uzyskanych wyników.

Podsumowując, **metodyka pracy doktorskiej została zaplanowana i zrealizowana na wysokim poziomie naukowym, a zastosowane metody są zasadniczo adekwatne do postawionego celu badawczego i umożliwiają weryfikację przyjętych hipotez.** Uwagi dotyczące niektórych elementów metodyki, przedstawione w dalszej części recenzji, nie podważają jednak zasadniczej poprawności przyjętego podejścia badawczego. Mają one przede wszystkim charakter porządkujący, dyskusyjny i mogą stanowić podstawę do doprecyzowania sposobu opisu badań.

Uwaga 2. W dysertacji Doktorant stosuje zamiennie określenia „izolat" i „szczep", co z punktu widzenia poprawności terminologicznej wymaga doprecyzowania. Pojęcia te nie są tożsame. W związku z tym wskazane byłoby konsekwentne stosowanie właściwego terminu w zależności od etapu identyfikacji i charakteru badanego materiału oraz jednoznaczne zdefiniowanie tych pojęć w części metodycznej pracy.

Uwaga 3. W odniesieniu do analizy statystycznej warto byłoby doprecyzować, czy w przypadku wszystkich analiz spełnione zostały założenia testu χ^2 dotyczące liczebności oczekiwanych w poszczególnych komórkach tabel kontyngencji. Ze względu na stosunkowo niewielką liczebność grupy izolatów pochodzących ze środowiska przetwórstwa żywności (n = 13), w wybranych analizach zasadne mogłoby być zastosowanie testu dokładnego Fishera lub przedstawienie uzasadnienia wyboru testu χ^2.

Uwaga 4. W rozdziale 5.5.5.2. Ekspresja genów wirulencji i oporności na antybiotyki Doktorant lakonicznie stwierdza, że „Jako gen referencyjny zastosowano gen kodujący 16S rRNA, który wykazuje stabilność pod wpływem HPP". Jednak w przypadku analizy ekspresji genów metodą RT-qPCR warto byłoby szerzej uzasadnić wybór 16S rRNA jako genu referencyjnego oraz wskazać, czy jego stabilność ekspresji została zweryfikowana w warunkach zastosowanego stresu HPP oraz podczas regeneracji komórek. Ponieważ przedmiotem badań były zmiany

transkrypcyjne wywołane silnym stresem fizycznym, potwierdzenie stabilności genu referencyjnego jest istotne dla wiarygodności względnej oceny ekspresji analizowanych genów.

Ocena wyników badań

W rozdziale 6. Doktorant przedstawił wyniki badań, które szczegółowo zostały opisane w publikacjach P1-P3. Zaprezentowany materiał badawczy jest obszerny, a uzyskane wyniki stanowią wartościowy materiał eksperymentalny i pozwalają na wieloaspektową ocenę analizowanego problemu badawczego.

Na szczególne podkreślenie zasługuje jakość uzyskanych wyników, które zostały przedstawione w sposób uporządkowany i logiczny. Wyniki badań są w znacznej mierze prezentowane w czytelnej formie, z wykorzystaniem odpowiednio dobranych tabel i rycin, co ułatwia ich analizę oraz ocenę zależności i różnic pomiędzy badanymi wariantami. Sposób prezentacji danych umożliwia prześledzenie kolejnych etapów postępowania badawczego oraz ocenę uzyskanych efektów. **Przedstawiony w dysertacji zakres wyników uznaję za wystarczająco kompletny w odniesieniu do postawionych celów i hipotez badawczych**.

Należy podkreślić, że uzyskane wyniki tworzą spójny materiał eksperymentalny i wpisują się w obszar dyscypliny naukowej technologia żywności i żywienia, dotyczą problematyki istotnej zarówno z punktu widzenia poznawczego, jak i potencjalnych zastosowań w obszarze bezpieczeństwa i jakości żywności. Przedstawiony materiał eksperymentalny wzbogaca wiedzę dotyczącą analizowanego zagadnienia i może stanowić podstawę do dalszych badań w tym obszarze.

Podsumowując, **wyniki badań przedstawione w dysertacji charakteryzują się odpowiednią jakością, są przygotowane i zaprezentowane w sposób zasadniczo prawidłowy, a ich interpretacja jest spójna z założeniami pracy**. Pomimo sformułowanych w recenzji uwag i sugestii, całościową ocenę wyników badań, ich zakresu, sposobu prezentacji oraz wykorzystania do realizacji założonych celów uznaję za pozytywną.

Uwaga 5. Wydaje się zasadne nieco ostrożniejsze interpretowanie wyników dotyczących obecności genów wirulencji i genów oporności. Detekcja określonego genu metodą PCR potwierdza jego obecność w genomie badanego szczepu, nie przesądza natomiast o jego ekspresji ani o poziomie aktywności kodowanego czynnika. W związku z tym wnioski dotyczące

potencjału wirulencji lub mechanizmu oporności mogłyby być formułowane z uwzględnieniem tego ograniczenia.

Uwaga 6. W odniesieniu do wyników RT-qPCR zasadne byłoby doprecyzowanie kryteriów oceny istotności zmian ekspresji genów. Przyjęcie wartości względnej ekspresji ≥2 lub ≤0,5 jako kryterium zwiększenia lub zmniejszenia ekspresji nie powinno być utożsamiane z istotnością statystyczną. Warto byłoby zatem przedstawić również informację o zmienności pomiarów oraz zastosowanych metodach statystycznej oceny różnic ekspresji.

Uwaga 7. Wydaje się, że w odniesieniu do zmian ekspresji genów oraz cech fenotypowych utrzymujących się po HPP bardziej precyzyjne byłoby określenie ich jako „persistent" lub „maintained during the tested recovery period" niż „permanent". Uzyskane wyniki potwierdzają utrzymywanie się obserwowanych zmian po przywróceniu optymalnych warunków, jednak nie pozwalają na jednoznaczne określenie ich trwałości w dłuższej perspektywie czasowej.

Uwaga 8. W zakresie przedstawienia wyników warto byłoby bardziej bezpośrednio powiązać dane dotyczące częstości transferu genów z liczebnością żywych komórek dawcy w poszczególnych wariantach doświadczenia. Ze względu na znaczne różnice w przeżywalności *L. monocytogenes* po zastosowaniu HPP, równoległe przedstawienie liczby żywych komórek dawcy, liczby uzyskanych transkoniugantów oraz obliczonej częstości transferu ułatwiłoby właściwą interpretację wpływu HPP na transfer genów.

Uwaga 9. W interpretacji wyników ERIC-PCR wskazana byłaby większa ostrożność w formułowaniu wniosków dotyczących rearanżacji materiału genetycznego indukowanych przez HPP. Zmiana profilu ERIC-PCR potwierdza różnice w profilu genotypowym badanych transkoniugantów, jednak bez zastosowania bardziej rozdzielczych metod genotypowania nie pozwala jednoznacznie określić charakteru tych zmian ani przypisać ich konkretnym rearanżacjom lub mutacjom.

Ocena dyskusji wyników i wniosków

W rozdziale 7. Dyskusja Doktorant omówił uzyskane wyniki w kontekście analizowanego

problemu badawczego oraz w odniesieniu do wyników badań innych autorów. Przedstawił znaczenie swoich badań dla bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności oraz w świetle uzyskanych dowodów naukowych wskazał na etapy, które wymagają szczególnej uwagi i udoskonalenia w tym obszarze.

Dyskusję wyników oraz sformułowane na ich podstawie wnioski oceniam pozytywnie. Dyskusja stanowi istotny element dysertacji i w zasadniczej części właściwie odnosi się do uzyskanych wyników, pozwalając na ich interpretację w kontekście założonych celów badawczych oraz aktualnego stanu wiedzy. Na szczególne podkreślenie zasługuje umiejętność interpretacji uzyskanych wyników oraz próba wyjaśnienia obserwowanych zależności i różnic w oparciu o wyniki badań własnych. Doktorant w większości przypadków właściwie wskazał najważniejsze prawidłowości wynikające z przeprowadzonych doświadczeń i podjął próbę wyjaśnienia ich możliwych przyczyn.

Pozytywnie również oceniam odniesienie wyników badań własnych do literatury przedmiotu**.** Doktorant wykorzystał wyniki wcześniejszych badań do przedstawienia szerszego kontekstu analizowanych zjawisk, wskazując zarówno na zgodności, jak i różnice pomiędzy rezultatami własnymi a doniesieniami innych autorów. Takie zestawienie pozwala na właściwe osadzenie uzyskanych wyników w aktualnym dorobku naukowym i podkreśla ich znaczenie na tle dotychczasowego stanu wiedzy.

Pewnym zastrzeżeniem może być natomiast niewystarczająco pogłębiona, krytyczna analiza części uzyskanych rezultatów**.** W niektórych miejscach dyskusja mogłaby w większym stopniu uwzględniać ograniczenia zastosowanego podejścia badawczego, np. warto byłoby wyraźniej rozdzielić bezpośredni efekt stresu HPP od zmian zachodzących podczas późniejszej regeneracji komórek. W przypadku wariantu 400 MPa analizę transferu genów przeprowadzano po odzyskaniu zdolności wzrostu przez komórki, dlatego obserwowane zmiany mogą być wynikiem zarówno działania stresu wysokociśnieniowego, jak i procesów adaptacyjnych zachodzących podczas regeneracji. W mojej opinii dyskusję mogłyby wzbogacić alternatywne wyjaśnienia obserwowanych efektów oraz potencjalnych czynników wpływających na uzyskane wyniki. Bardziej krytyczne odniesienie do własnych rezultatów pozwoliłoby dodatkowo zwiększyć wartość naukową dyskusji i nadać jej bardziej pogłębiony charakter. Uwaga ta nie podważa jednak zasadniczo pozytywnej oceny tego elementu dysertacji.

Uwaga 10. Uwzględniając aktualny stan wiedzy oraz potrzebę zachowania rzetelności naukowej, wskazane byłoby uzupełnienie tej sekcji o informację dotyczącą aktualizacji zasad interpretacji wartości MIC dla trimetoprimu z sulfametoksazolem (TMP-SMX). Doktorant powinien zaznaczyć, że w 2025 r. EUCAST podjął działania zmierzające do rewizji wartości granicznych dla tego połączenia, co ma znaczenie dla współczesnej interpretacji wyników uzyskanych w badaniach. Jednocześnie należy wskazać, że wyniki uzyskane i zinterpretowane zgodnie z kryteriami EUCAST obowiązującymi w okresie realizacji badań powinny być odnoszone do ówczesnej wersji wytycznych.

Doktorant dokonał twórczej syntezy uzyskanych wyników i wykazał się umiejętnością wskazywania najważniejszych prawidłowości wynikających z przeprowadzonych doświadczeń oraz formułowania na ich podstawie uzasadnionych wniosków, które przedstawił w rozdziale 8. Doktorant poprawnie sformułował 14 wniosków podsumowujących, które wynikają z przeprowadzonych badań, pozostając w związku z postawionymi celami oraz hipotezami badawczymi. Przedstawione wnioski wskazują na osiągnięcie zakładanych celów pracy oraz potwierdzają poznawczy charakter i potencjał aplikacyjny przedstawionej do oceny dysertacji. W podsumowaniu badań Doktorant przedstawił najistotniejsze ustalenia wynikające z rezultatów pracy, podał również kierunki dalszych badań.

Podsumowując, **Dyskusję i Wnioski oceniam pozytywnie. Doktorant wykazał się umiejętnością interpretacji wyników własnych, ich konfrontowania z dostępną literaturą oraz formułowania wniosków na podstawie przeprowadzonych badań**. Wskazana potrzeba bardziej pogłębionej i krytycznej analizy wybranych rezultatów stanowi przede wszystkim sugestię doskonalącą i nie zmienia ogólnej pozytywnej oceny tej części dysertacji.

Uwzględniając całokształt przedstawionych badań, **stwierdzam że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego**. Doktorant wykazał, że zastosowanie technologii HPP prowadzi do zmian w ekspresji genów oporności i wirulencji u szczepów *L. monocytogenes*, przejściowych lub utrwalonych zmian cech fenotypowych oraz wzrostu częstości transferu genów. Efekty te były zmienne i zależne od szczepu, parametrów obróbki oraz środowiska. **Praca wnosi nową wiedzę do dyscypliny technologia żywności i żywienia** na temat mechanizmów adaptacyjnych *L. monocytogenes* w odpowiedzi na stres wysokiego ciśnienia oraz wskazuje, że ocena bezpieczeństwa żywności

powinna uwzględniać również monitorowanie zmian transkrypcyjnych i zmiany fenotypów opornych, aby zapobiec rozprzestrzenianiu się trudnych do zwalczenia patogennych szczepów *L. monocytogenes*.

W związku z przedstawionymi wynikami oraz ich znaczeniem dla bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności, podczas dyskusji chciałabym poprosić Doktoranta o odniesienie się do następujących zagadnień:

1. W świetle wyników całej rozprawy HPP należy postrzegać nie tylko jako skuteczną metodę inaktywacji *L. monocytogenes*, ale również czynnik stresowy mogący prowadzić do selekcji i modyfikacji populacji bakterii. Jakie konsekwencje wynikają z tego dla bezpieczeństwa żywności? Jakie zmiany w parametrach procesu HPP oraz w procedurach kontroli mikrobiologicznej produktu po procesie można, w opinii Doktoranta, rozważyć w świetle uzyskanych wyników?

2. Dlaczego wyników uzyskanych w modelu laboratoryjnym nie należy bezpośrednio ekstrapolować na matrycę żywnościową? Jakie znaczenie dla odpowiedzi *L. monocytogenes* na stres HPP ma skład i charakter matrycy żywnościowej oraz z czego wynikał wybór soku marchwiowego jako matrycy zastosowanej w badaniach *in situ*?

III. Wniosek końcowy

W ostatecznej ocenie stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Patryka Wiśniewskiego, pt. „Wpływ technologii wysokich ciśnień (HPP) na zmiany w wirulencji i antybiotykooporności szczepów *Listeria monocytogenes* izolowanych z żywności i środowiska jej produkcji" charakteryzuje się bardzo wysoką wartością naukową, a przedstawione przez mnie nieliczne uwagi, nie umniejszają jej merytorycznej wartości poznawczej oraz znaczenia podjętego problemu badawczego.

Uważam, że oceniana dysertacja **spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim**, określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Doktorant wykazał się wysokimi kompetencjami w zakresie samodzielnego prowadzenia badań

naukowych oraz opracowywania i interpretacji uzyskanych wyników.

Wnioskuję zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o **przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pana mgr. inż. Patryka Wiśniewskiego do publicznej obrony**. Jednocześnie, ze względu na bardzo wysoką wartość naukową, kompleksowość badań oraz istotny wkład w rozwój dyscypliny technologia żywności i żywienia, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

