

AUTOREFERAT

dr Waldemar Stanisław Paszkiewicz

Katedra Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin 2018

1. Imię i nazwisko:

Waldemar Stanisław Paszkiewicz

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

- stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych w zakresie higieny żywności zwierzęcego pochodzenia, nadany uchwałą Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej w Lublinie z dn. 16 września 1999 r.; tytuł rozprawy doktorskiej: „Obciążenie odpływów z rzeźni substancjami biologicznymi i chemicznymi oraz próba ich ograniczenia” (promotor: prof. dr hab. Elżbieta Pełczyńska; recenzenci: prof. dr hab. Edmund Prost i prof. dr hab. Antoni Kopczewski)
- tytuł: lekarz weterynarii (dyplom lekarza weterynarii nr 18983/W/87 z dn. 20 maja 1987 r. wydany przez Akademię Rolniczą w Lublinie)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych:

01.07.2018 r. do dnia dzisiejszego: Katedra Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczy w Lublinie; starszy wykładowca

01.02.2000 r. – 30.06.2018 r.: Katedra Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy (do 2008 r. Akademia Rolnicza) w Lublinie; adiunkt

01.09.1991 r. – 31.01.2000 r.: Katedra (do 1993 r. Instytut) Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia, Wydział Weterynaryjny Akademii Rolniczej w Lublinie; asystent (od 16.09.1999 r. ze stopniem naukowym doktora)

01.09.1990 – 31.08.1991 r.: Instytut Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia, Wydział Weterynaryjny Akademii Rolniczej w Lublinie; asystent stażysta

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 i poz. 1311):

a) osiągnięciem naukowym jest tematyczny cykl publikacji objęty tytułem:

Analiza mikrobiologicznego zanieczyszczenia jadalnych tkanek pozyskiwanych od ślimaków wolno żyjących i hodowlanych w Polsce

b) publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe:

1. **Paszkiwicz W.**, Ziomek M., Szkucik K., Maćkowiak-Dryka M.: Pozyskiwanie i jakość zdrowotna mięsa ślimaków. *Medycyna Weterynaryjna* 2014, 70, 673-679; IF: **0,218**, punkty MNiSW: **15**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu jej koncepcji, zgromadzeniu piśmiennictwa, opracowaniu wstępnej i przygotowaniu końcowej wersji manuskryptu, a także na jego korekcie po recenzji (autor korespondencyjny). Mój udział szacuję na 75%.

2. **Paszkiwicz W.**, Kozyra I., Rzeżutka A.: A refinement of an International Standard Method (ISO/TS 15216–2:2013) to allow extraction and concentration of human enteric viruses from tissues of edible snail species. *Food Analytical Methods* 2015, 8, 799–806; doi:10.1007/s12161-014-0077-3; IF: **2,167**, punkty MNiSW: **30**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w planowaniu doświadczeń, wykonaniu części badań i analizy statystycznej, interpretacji wyników badań, opracowaniu wstępnej i przygotowaniu końcowej wersji manuskryptu, a także na jego korekcie po recenzji. Mój udział szacuję na 60%.

3. **Paszkiwicz W.**, Kozyra I., Bigoraj E., Ziomek M., Rzeżutka A.: A molecular survey of farmed and edible snails for the presence of human enteric viruses: Tracking of the possible environmental sources of microbial molluscs contamination. *Food Control* 2016, 69, 368-372; doi:10.1016/j.foodcont.2016.04.052; IF: **3,496**, punkty MNiSW: **40**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współpracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu części analiz bakteriologicznych, interpretacji i opracowaniu wyników badań bakteriologicznych, wykonaniu analizy statystycznej, przeprowadzeniu wizji lokalnej w gospodarstwie produkcyjnym, a także na opracowaniu wstępnej i przygotowaniu końcowej wersji manuskryptu. Mój udział szacuję na 55%.

4. **Paszkiewicz W.**, Szkucik K., Ziomek M., Gondek M., Pyz-Łukasik R.: Występowanie drobnoustrojów rodzajów *Salmonella* i *Listeria* w mięsie ślimaków jadalnych. *Medycyna Weterynaryjna* 2018, 74, 110-113; doi: dx.doi.org/10.21521/mw.6074; IF **0,197**, punkty MNiSW: **15**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu części oznaczeń, analizie i interpretacji wyników, opracowaniu wstępnej i przygotowaniu końcowej wersji manuskryptu, a także na jego korekcie po recenzji (autor korespondencyjny). Mój udział szacuję na 80%.

5. **Paszkiewicz W.**, Szkucik K., Ziomek M., Pyz-Łukasik R., Drozd Ł., Bełkot Z.: Zmienność zanieczyszczenia mikrobiologicznego mięsa ślimaków jadalnych w zależności od gatunku i miejsca ich pozyskania. *Medycyna Weterynaryjna* 2018, 74, 591-598; doi: dx.doi.org/10.21521/mw.5970; IF **0,197**, punkty MNiSW: **15**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu części oznaczeń, analizie i interpretacji wyników oraz opracowaniu wstępnej i przygotowaniu końcowej wersji manuskryptu, a także na jego korekcie po recenzji (autor korespondencyjny). Mój udział szacuję na 85%.

Łączna punktacja prac składających się na jednotematyczny cykl publikacji:

- według listy MNiSW: **115 pkt**

- łączny *impact factor* według listy JCR: **6,275**

Dla publikacji nr 4 i 5 (opublikowanych w 2018 r.) podano aktualny IF za 2017 r.

c) omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Jadalne mięczaki (*Mollusca*), do których należą małże (*Bivalvia*), głowonogi (*Cephalopoda*) i ślimaki (*Gastropoda*) ze względu na powszechne występowanie na całej kuli ziemskiej stanowiły i stanowią atrakcyjne, łatwo dostępne i tanie źródło pożywienia. Wśród jadalnych mięczaków szczególne miejsce zajmują wybrane gatunki ślimaków lądowych, które od tysięcy lat były elementem diety człowieka. Udokumentowane odkrycia archeologiczne dowiodły, że ludzie spożywali ślimaki już 10,5 tys. lat p.n.e. (15). Niektórzy autorzy sugerują, że ślimaki lądowe były pierwszymi udomowionymi przez człowieka zwierzętami (11). Chów i hodowla ślimaków lądowych prowadzone były na dużą skalę już przez starożytnych Rzymian, którzy traktowali jadalne tkanki ślimaków, szczególnie winniczków, jako doskonały przysmak

oraz cenili ich właściwości odżywcze (42). W średniowiecznej Europie szczególną rolę w rozwoju wsi odgrywały zakony cystersów i benedyktynów. W przyklasztornych parkach prowadzono również hodowlę i tucz ślimaków, a ślimaki traktowane były jako danie postne i alternatywne źródło białka. W czasach współczesnych odrodzenie zainteresowania lądowymi ślimakami jadalnymi nastąpiło w latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych XX w. Przełożyło się to na wzrost spożycia jadalnych tkanek ślimaków (zwanych dalej mięsem) we Francji, Włoszech oraz w Anglii, Hiszpanii i Portugalii. Gwałtowne zwiększenie popytu spowodowało masowe pozyskiwanie ślimaków z naturalnych siedlisk, a w konsekwencji stopniowe zmniejszanie się populacji ślimaków wolno żyjących. Alternatywą dla zanikających naturalnych populacji było tworzenie ferm hodowlanych, które miały zapewnić stałą dostawę wartościowego surowca. Pierwsze fermy ślimaków powstały w 1975 r. we Francji. W latach osiemdziesiątych XX w. metody hodowli ślimaków udoskonalili naukowcy z francuskiego Narodowego Instytutu Badań Rolniczych (INRA - l'Institut National de la Recherche Agronomique) dając początek nowemu działowi alternatywnej produkcji zwierzęcej zwanemu helikulturą. Opracowali oni trzy systemy hodowli ślimaków: zamknięty (interiorowy), zewnętrzny (eksteriorowy) i mieszany. Każdy z tych systemów składa się ze stałych, następujących po sobie faz związanych z etapami wzrostu ślimaków. Cykl hodowlany rozpoczyna się wybudzaniem zahibernowanych reproduktorów, po czym następuje kopulacja i składanie jaj, które poddaje się inkubacji. Otrzymany wylęg stanowi wyjściowy materiał hodowlany. Sam chów ślimaków przebiega dwuetapowo. Pierwszy etap to odchów tzw. młodzieży („osesków”), drugi to tucz właściwy, po którego zakończeniu następuje zbiór ślimaków. Pierwsze polskie hodowle ślimaków powstały w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku w regionie południowo-wschodnim i południowo-zachodnim kraju, a kolejne w województwach wielkopolskim i warmińsko-mazurskim (16). Ze względu na warunki klimatyczne Polski wszystkie krajowe fermy produkcyjne prowadzą hodowlę ślimaków w systemie mieszanym. Kolejne etapy hodowli są w nim ściśle powiązane ze zmieniającymi się porami roku. Cykl hodowlany rozpoczyna się w połowie lutego i trwa od 5 do 7 miesięcy. Reprodukacja, inkubacja, lęgi i odchów ślimaków do osiągnięcia masy ciała 0,5 g odbywają się w pomieszczeniach, w kontrolowanych warunkach. Wstępny tucz ślimaków w okresie wiosennym (marzec - kwiecień) odbywa się w tunelach foliowych w odpowiedniej temperaturze ($>15^{\circ}\text{C}$) i przy długim dniu świetlnym (12-18 h). Po okresie 1 do 1,5 miesiąca (maj), gdy średnia temperatura dobowa nie spada poniżej

10°C ślimaki przenosi się na poletka w parkach hodowlanych. Parki te są przygotowane do hodowli ślimaków, zarówno pod względem wysianej na poletkach roślinności (rzepik, perko, rzodkiew, burak, słonecznik, sałata lub gorczyca), jak i wyposażenia (ogrodzenie, szlaki komunikacyjne i tzw. paśniki). W okresie tuczu właściwego ślimaki dokarmiane są zbilansowanymi mieszankami śrut zbożowych. Ważnym elementem tego etapu jest systematyczne zraszanie parku w celu zapewnienia odpowiedniej wilgotności. Tucz trwa zazwyczaj do końca września, po czym dokonuje się zbioru. Na 10 dni przed rozpoczęciem zbiorów zaprzestaje się zraszania i dokarmiania ślimaków, co powoduje opróżnienie przez nie przewodu pokarmowego, jak również ułatwia ich wejście w stan hibernacji. Ślimaki zbierane są do worków kaszlowych, a następnie w ciągu tygodnia obsuszane pod wiatą, w zacienionym tunelu foliowym lub w suszarni. W trakcie obsuszania ślimaki wchodzą w stan hibernacji (nie wykazują ruchu, a ujście muszli zasklepiają epifragmą), w którym to stanie są przechowywane i transportowane. Zgodnie z obowiązującymi przepisami prawa ślimaki utrzymywane w warunkach fermowych zaliczane są w Polsce do zwierząt akwakultury, a fermy hodowlane ślimaków mogą być klasyfikowane jako dwa rodzaje przedsiębiorstw sektora akwakultury (9, 35, 39). Pierwszą liczącą 215 podmiotów grupą są podlegające obowiązkowi rejestracji przedsiębiorstwa wprowadzające na rynek zwierzęta akwakultury wyłącznie w celu spożycia przez ludzi w ramach sprzedaży bezpośredniej. Drugą grupę stanowi 341 podlegających zatwierdzeniu przedsiębiorstw produkcyjnych sektora akwakultury. Jednocześnie na terenie kraju funkcjonuje 10 zakładów pozyskujących i przetwarzających mięso ślimaków (43). Polska od kilkunastu lat jest cenionym producentem i dostawcą ślimaków hodowlanych i wolno żyjących oraz ich mięsa. W polskich fermach utrzymywane są 2 podgatunki ślimaka szarego: ślimak szary mały (*Cornu aspersum aspersum*) i szary duży (*Cornu aspersum maxima*). Ponadto w kraju, na zasadach określonych w rozporządzeniu ministra środowiska (36), pozyskiwane są w okresie od 20 kwietnia do 31 maja, podlegające częściowej ochronie gatunkowej, żyjące w warunkach naturalnych ślimaki winniczki (*Helix pomatia*). Produkcja ślimaków żywych i przetworzonych została objęta szczegółową statystyką Głównego Urzędu Statystycznego (GUS) dopiero w 2004 r. (www.stat.gov.pl/banki-i-bazy-danych/handel-zagraniczny/). Według danych GUS największe ilości żywych i przetworzonych ślimaków lądowych eksportowano z Polski w latach 2004-2007. W tym okresie rocznie sprzedawano ponad 400 ton wymienionych produktów o wartości przekraczającej 8 mln zł. W kolejnych latach wskutek spadku popytu na mięso

ślimaków, zmniejszył się również eksport, który jednak aż do 2015 r. przekraczał 200 t w skali roku. Od 2016 r. roczny poziom eksportu żywych i przetworzonych ślimaków wynosi niespełna 130 ton, a jego wartość sięga prawie 4 mln zł. Przytłaczająca większość pozyskanych w Polsce żywych ślimaków oraz ich mięsa trafia na rynki innych krajów UE, przede wszystkim Francji, Czech, Niemiec, Włoch, Litwy, Węgier, Rumunii i Austrii. Natomiast w 2017 i 2018 r. odnotowano po raz pierwszy sprzedaż wymienionych produktów na rynki krajów trzecich, a mianowicie Ukrainy i Republiki Południowej Afryki. Użytkowanie ślimaków jest wielokierunkowe. Do celów spożywczych wykorzystuje się mięso, a także solone jajeczka ślimaków (substytut kawioru zwany powszechnie „kawiolem ślimaczym” lub „białym kawiolem”). Od ślimaków zbiera się także śluz wykorzystywany w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym, a pozyskaną z gruczołu białkowego winniczka lektynę (*Helix pomatia* agglutinin) wykorzystuje się w diagnostyce mikrobiologicznej i onkologicznej oraz badaniach histochemicznych. Dominującym kierunkiem użytkowania ślimaków jest jednak produkcja mięsa. Mięso to, jak każdy środek spożywczy musi spełniać kryterium bezpieczeństwa, które jest warunkiem decydującym o możliwości wprowadzenia żywności na rynek. Bezpieczeństwo rozumiane jest jako brak zagrożeń tła biologicznego (w tym mikrobiologicznego), chemicznego i fizycznego, co oznacza, że spożycie takiego środka nie spowoduje negatywnych skutków dla zdrowia konsumenta. Ze względu na różnorodność środowisk bytowania ślimaków pozyskiwanych przez zbiory z siedlisk naturalnych oraz różne warunki utrzymania ślimaków w fermach hodowlanych różne mogą też być rodzaje i natężenie zagrożeń u ślimaków pozyskanych z różnych biotopów. Rygorystyczne przestrzeganie wymagań sanitarnych i higienicznych w trakcie produkcji jest ważnym aspektem zapewnienia bezpieczeństwa (37). Obowiązujące przepisy prawne (34) wyznaczają jedynie kryteria bezpieczeństwa mikrobiologicznego dla gotowanego mięsa ślimaków lądowych (brak *Salmonella spp.*) oraz żywności gotowej do spożycia (RTE) wytworzonej z udziałem takiego mięsa (brak lub określona liczba *L. monocytogenes*). Nie odnoszą się natomiast do surowego mięsa ślimaków oraz nie określają kryteriów w zakresie higieny procesu pozyskiwania półproduktu, którym jest gotowane mięso ślimaków. Brak jest więc wskaźnikowych wartości zanieczyszczenia, które pozwalałyby zaakceptować jakość mikrobiologiczną procesu produkcji lub uznać ją za niezadowalającą. Dane piśmiennictwa również nie dają wyczerpujących informacji

na temat mikrobiologicznego statusu mięsa ślimaków. Szczególny deficyt wiedzy w tym względzie dotyczy mięsa ślimaków pozyskiwanych w Polsce.

Celem badań przeprowadzonych w ramach osiągnięcia naukowego było:

- określenie występowania bakterii chorobotwórczych w jadalnych tkankach ślimaków wolno żyjących i hodowlanych w Polsce zależności od gatunku oraz miejsca ich pozyskania
- określenie poziomu zanieczyszczenia mikrobiologicznego jadalnych tkanek ślimaków wolno żyjących i hodowlanych w Polsce zależności od gatunku oraz miejsca ich pozyskania
- udoskonalenie znormalizowanej metody izolacji i koncentracji wirusów (ISO/TS 15216–2:2013) dla potrzeb badania jadalnych tkanek ślimaków
- ocena możliwości zanieczyszczenia jadalnych tkanek ślimaków pozyskiwanych w Polsce pochodzącymi ze środowiska chorobotwórczymi dla człowieka wirusami przenoszonymi drogą pokarmową.

Występowania bakterii chorobotwórczych (*Salmonella spp.*, *E. coli*, *Listeria spp.*, gronkowce koagulazododatnie) w mięsie ślimaków wolno żyjących i hodowlanych w zależności od gatunku oraz miejsca ich pozyskania

(praca nr 1, 4 i 5)

Ze względu na wyznaczone kryteria bezpieczeństwa występowanie bakterii chorobotwórczych w pozyskiwanym ze ślimaków mięsie jest dosyć szeroko opisane w literaturze przedmiotu. W pracy nr 1 dokonałem usystematyzowania danych piśmiennictwa dotyczących obecności w mięsie ślimaków najważniejszych patogenów, tj. *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes*, gronkowców koagulazododatnich, *E. coli*, *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.*, *Y. enterocolitica* oraz pleśni i drożdży, a także innych potencjalnie chorobotwórczych mikroorganizmów. W aspekcie zagrożeń bezpieczeństwa przedstawiłem także problematykę związaną ze ślimakami jako wektorami inwazji przywr (*Fasciola hepatica* i *F. gigantica*) oraz bioindykatorami zanieczyszczenia środowiska metalami ciężkimi i związkami fosforoorganicznymi. Ostatnim elementem omawianej pracy ściśle związanym z bezpieczeństwem mięsa ślimaków jest szczegółowy opis technologicznego procesu jego pozyskiwania z wyznaczonymi krytycznymi punktami kontrolnymi (CCP). Należy podkreślić, że jest to w krajowym piśmiennictwie pierwsze tego typu przeglądowe opracowanie, w którym kompleksowo ujęto najważniejsze aspekty jakości zdrowotnej mięsa ślimaków.

Materiałem do badań własnych opisanych w pracach nr 4 i 5 były próbki surowego i mrożonego (po gotowaniu) mięsa wolno żyjących winniczków (HP) pozyskanych na terenie województw wielkopolskiego i dolnośląskiego oraz ślimaków hodowlanych *C. aspersum aspersum* (CAA) i *C. aspersum maxima* (CAM) pochodzących z 2 ferm stosujących mieszany system hodowli i zlokalizowanych na terenie wymienionych województw. Obecność drobnoustrojów z rodzaju *Salmonella* oznaczyłem łącznie w 300 próbkach, bakterii z rodzaju *Listeria* w 240, a gronkowców koagulazododatnich i *E. coli* w 360 próbkach. Badaniu w kierunku obecności salmonelli i listerii poddałem również 4 pulowane próbki gleby każda o masie 0,5 kg, w tym 2 pochodzące z tunelu foliowego (etap tuczu wstępnego) i 2 z poletek w parku (etap tuczu właściwego). Procedurę oznaczania wszystkich wymienionych drobnoustrojów przeprowadziłem w oparciu o schematy postępowania zawarte w nakazanych do stosowania (34) normach ISO (26, 27, 28, 31). Identyfikacji gatunkowej *L. monocytogenes* dokonano techniką PCR.

W żadnej z przebadanych 180 próbek surowego mięsa nie stwierdziłem obecności pałeczek rodzaju *Salmonella*. Wskazuje to na brak tych patogenów zarówno w naturalnym środowisku bytowania winniczków, jak również w środowisku obu hodowli ślimaków z rodzaju *Cornu*, co potwierdziły również ujemne wyniki badań próbek gleby z tunelu i poletek. Brak tych patogenów w surowym mięsie ślimaków hodowlanych wynika z kontrolowanych warunków ich utrzymania oraz wdrożonych w gospodarstwach zasad dobrych praktyk rolniczych (GAP). Natomiast w przypadku mięsa winniczków wskazuje na dobry status sanitarny środowiska naturalnego w regionach, z których pozyskano ślimaki. Salmonelli nie wyizolowano także z próbek mięsa mrożonego (n=120), co świadczy o skutecznym wykluczeniu w procesie technologicznym możliwości kontaktu gotowego produktu z pierwotnym źródłem zanieczyszczenia, za które powszechnie uznaje się surowe mięso ślimaków (2, 7, 20, 23).

Potwierdzeniem dobrego statusu higienicznego środowisk, z których pozyskano ślimaki były uzyskane wyniki badań w kierunku pałeczki okrężnicy. W żadnej z 360 próbek mięsa nie stwierdziłem *E. coli* (poziom zanieczyszczenia poniżej 1 log jtk/g). *E. coli* uważana jest za wskaźnik świeżego zanieczyszczenia kałowego (cyt. 8). Brak glukuronidazododatnich *E. coli* w próbkach surowego mięsa wskazuje na niewystępowanie tego rodzaju zanieczyszczenia w środowiskach bytowania ślimaków. Jest to ważne w związku z doniesieniami wskazującymi na odchody ssaków jako

atrakcyjne pożywienie dla ślimaków oraz na regularne spożywanie przez ślimaki gleby, jako źródła niezbędnych dla nich kwasów humusowych (4). *E. coli* dosyć często izolowana jest z surowego mięsa ślimaków, a odsetek zanieczyszczonych nią próbek waha się o 5 do 25% (6, 19). Jednak bez względu na poziom wyjściowego zanieczyszczenia mięsa, jego obróbka termiczna skutecznie redukuje liczbę *E. coli* poniżej granicy wykrywalności metody (23, 38).

Bakterie z rodzaju *Listeria* występowały w 101 (42,1%) przebadanych próbkach mięsa ślimaków. Szczególnie wysoki stopień zanieczyszczenia listeriami dotyczył mięsa surowego. Występowały one w 35% do 75% badanych próbek. Obecność *Listeria spp.* stwierdzono również we wszystkich badanych próbkach gleby. Wskazuje to, że listerie są stałym składnikiem mikroflory naturalnie występującej w środowisku hodowlanym ślimaków i przez to powinny być zawsze rozważane jako potencjalny czynnik ryzyka dla zdrowia ludzi. Obróbka termiczna mięsa w znacznym stopniu ograniczała, ale nie eliminowała listerii w mięsie mrożonym. Częstotliwość ich występowania w próbkach mięsa mrożonego była od 1,6 do 6,5 raza niższa w porównaniu z mięsem surowym. Identyfikacji gatunkowej techniką PCR poddano 15 wyselekcjonowanych szczepów, w tym 11 z próbek mięsa surowego i 4 z mięsa gotowanego. Jako *Listeria monocytogenes* rozpoznano 5 (2,1% ogółu przebadanych próbek i 4,95% próbek obciążonych listeriami) izolatów. Pochodziły one wyłącznie z próbek surowego mięsa ślimaków hodowlanych, w tym jeden z fermy w woj. wielkopolskim (od CAA) i cztery z fermy w woj. dolnośląskim (3 od CAA i 1 od CAM). *L. monocytogenes* wykrywana jest najczęściej w początkowych fazach produkcji mięsa ślimaków, począwszy od etapu odbioru żywych zwierząt, poprzez mycie, parowanie, aż do etapu usunięcia muszli (38). Dopiero kolejne etapy produkcyjne, czyli pierwsze i drugie gotowanie, powodują zniszczenie listerii zawartych w mięsie. Stąd też stwierdzenie obecności tych drobnoustrojów w surowym mięsie jest jednocześnie wskazaniem pierwotnego źródła zanieczyszczenia środowiska zakładu, a także ryzyka zanieczyszczenia listeriami gotowego produktu (14). Wyniki wstępnych badań dotyczących występowania *Salmonella spp.* i *Listeria spp.* w surowym mięsie ślimaków przedstawiono również w formie doniesienia konferencyjnego - zał. Nr 4, pkt B poz. 16.

Odsetek zanieczyszczonych gronkowcami próbek mięsa surowego i mrożonego wynosił odpowiednio od 50% (winniczki z obu województw) przez 86,7% (CAM z fermy w woj. dolnośląskim) aż do 100% (CAA i CAM z fermy w woj. wielkopolskim i CAM z fermy w woj. dolnośląskim). Wśród wyizolowanych szczepów dominowały

szczyepy koagulazoujemne, a najczęściej rozpoznawano *Staphylococcus epidermidis*, *S. warnei* i *S. haemoliticus*. Jedyne koagulazododatni szczep rozpoznany jako *S. aureus* subsp. *anaerobius* wyizolowałem z mrożonego mięsa CAM z fermy w woj. wielkopolskim. Wzrost zanieczyszczenia mięsa ślimaków gronkowcami koagulazododatnimi po każdym etapie produkcyjnym, w którym czynności przetwarzania mięsa wymagają ręcznego ich wykonywania jest często stwierdzaną sytuacją. Związane jest to najczęściej ze współistniejącym wysokim, poziomem zanieczyszczenia tymi drobnoustrojami dłoni personelu oraz sprzętów i powierzchni blatów wykorzystywanych w procesie produkcyjnym (18, 38).

Chorobotwórcze bakterie *Salmonella* spp., *E. coli*, *Listeria* spp. oraz gronkowce koagulazododatnie mogą występować w środowisku bytowania ślimaków jadalnych, a przez to stwarzać potencjalne zagrożenie dla zdrowia konsumenta. Skuteczne wdrożenie programów kontroli na etapie produkcji pierwotnej jest pierwszym działaniem, które może w znaczącym stopniu ograniczyć występowanie tych patogenów u ślimaków hodowlanych, jak i w pozyskiwanym z nich surowym mięsie. Podjęcie skutecznych środków zwalczania wymienionych patogenów na kolejnych etapach łańcucha żywnościowego, takich jak odpowiednia obróbka termiczna surowego mięsa czy przestrzeganie reżimu sanitarnego przy konfekcjonowaniu mięsa po obróbce termicznej zapewnia ich eliminację z produktu finalnego, którym jest mrożone, gotowane mięso ślimaków.

**Określenie poziomu zanieczyszczenia mikrobiologicznego mięsa ślimaków wolno żyjących i hodowlanych w zależności od gatunku oraz miejsca ich pozyskania
(praca nr 5)**

Ilościowe zanieczyszczenie żywności mikroflorą niepatogenną jest wykładnikiem jakości mikrobiologicznej surowców i wyprodukowanych z nich środków spożywczych. Poziom zanieczyszczenia mikrobiologicznego żywności rzutuje na jej trwałość oraz dostarcza informacji o przestrzeganiu w zakładach produkcyjnych zasad GHP/GMP, w tym stosowania skutecznych procesów obróbki termicznej.

Celem badań własnych opisanych w pracy nr 5 było określenie statusu mikrobiologicznego surowego i mrożonego (po gotowaniu) mięsa pozyskanego z jadalnych ślimaków wolno żyjących i hodowlanych. W przeprowadzonych badaniach materiał do analizy był tożsamy z opisanym w poprzednim podrozdziale, dotyczącym obecności patogenów. W pobranym materiale oznaczyłem ogólną liczbę bakterii

tlenowych, liczbę bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz z rodzajów: *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* i *Areomonas*, a także liczbę bakterii psychrotrofowych i proteolitycznych. Oznaczenia przeprowadziłem według odpowiednich Polskich Norm (25, 27, 29, 30, 32, 33), a w przypadku ich braku - według powszechnie przyjętych metodyk laboratoryjnych (5, 24). Analizom mikrobiologicznym w kierunku poszczególnych grup bakterii poddano po 180 próbek mięsa surowego i taką samą liczbę próbek mięsa mrożonego (po 30 próbek w obrębie każdego gatunku i każdego województwa). Wyniki oznaczeń opracowano statystycznie (pakiet Statistica 10 firmy StatSoft) wyliczając średnie arytmetyczne i odchylenia standardowe. Wartości zanieczyszczenia uzyskane dla poszczególnych grup drobnoustrojów porównano pomiędzy trzema gatunkami ślimaków, a w obrębie każdego gatunku pomiędzy dwoma rodzajami mięsa i dwoma miejscami pozyskania ślimaków. Wpływ czynników zmienności na oznaczane parametry określono w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji na poziomie istotności wynoszącym 5%. W celu ustalenia statystycznie istotnych różnic pomiędzy porównywanymi grupami zastosowano test post-hoc wielokrotnych przedziałów ufności T Tukeya dla $p < 0,05$.

Wyniki badań wykazały, że ogólne zanieczyszczenie bakteriami tlenowymi surowego mięsa ślimaków wahało się od 5,10 (HP z woj. dolnośląskiego) do 6,55 log jtk/g (CAM z woj. wielkopolskiego). Z wyjątkiem wykazującego najwyższe zanieczyszczenie mięsa CAM z woj. wielkopolskiego nie stwierdzono istotnych różnic między ogólnym zanieczyszczeniem drobnoustrojami tlenowymi surowego mięsa pozyskanego od poszczególnych gatunków ślimaków. Istotne zależności wystąpiły w zanieczyszczeniu surowego mięsa w odniesieniu do miejsca jego pozyskania. Wyższy poziom zanieczyszczenia tymi bakteriami stwierdzono w surowym mięsie wszystkich gatunków ślimaków z terenu woj. wielkopolskiego w porównaniu z mięsem ślimaków z woj. dolnośląskiego. Podobne zależności dotyczyły również w mięsa mrożonego, którego zanieczyszczenie wahało się od 4,25 (CAA z woj. dolnośląskiego) do 5,13 log cfu/g (CAM z woj. wielkopolskiego). Poziom zanieczyszczenia surowego mięsa ślimaków bakteriami tlenowymi jest odzwierciedleniem statusu mikrobiologicznego środowiska ich życia. Potwierdziły to wyniki badań próbek gleby z poletek parku hodowlanego fermy w woj. wielkopolskim (praca nr 3). Zanieczyszczenie to wynosiło 7,7 log jtk/g i mieściło się w przedziale odpowiadającym ziemi silnie zanieczyszczonej ($>7,0$ log cfu/g) (44). Jednocześnie było o ponad 1 log wyższe od zanieczyszczenia surowego mięsa ślimaków z rodzaju *Cornu* pochodzących

z tego gospodarstwa. Dostępne dane piśmiennictwa dają obraz dużej zmienności (od 2,5 przez 6-7 aż do ponad 8 log jtk/g) poziomu zanieczyszczenia bakteriami tlenowymi surowego mięsa w zależności od miejsca pozyskania i gatunku ślimaka (1, 20, 23, 41). Natomiast w porównaniu do uzyskanych w badaniach własnych, poziomy zanieczyszczenia mrożonego mięsa stwierdzone przez innych autorów były niższe o ponad 2 log (38, 41).

Stwierdzono powszechne występowanie bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* zarówno w surowym (73,3-96,7% próbek), jak i mrożonym (20-100% próbek) mięsie ślimaków. Zanieczyszczenie ilościowe surowego mięsa wahało się od 2,54 (HP z woj. dolnośląskiego) do 4,75 log jtk/g (CAA z fermy w woj. wielkopolskim) i było istotnie wyższe (od 1,0 do prawie 2 log) w mięsie ślimaków hodowlanych w porównaniu do mięsa winniczków. Zależność ta dotyczyła mięsa ślimaków z obu województw. Wysokie zanieczyszczenie stwierdzono także w próbkach ziemi z poletek parku hodowlanego fermy w woj. wielkopolskim (praca nr 3). Zanieczyszczenie to wynosiło 5,7 log jtk/g i co najmniej o 1 log przewyższało zanieczyszczenie surowego mięsa ślimaków pochodzących z tej fermy. W przypadku mięsa mrożonego poziom zanieczyszczenia był zdecydowanie niższy i wynosił od 0,50 (mięso ślimaków z woj. wielkopolskiego) do 1,65 log jtk/g (CAM z woj. dolnośląskiego). Z dostępnych danych wynika, że poziom zanieczyszczenia bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae* surowego mięsa ślimaków hodowlanych i wolno żyjących stwierdzany w badaniach innych autorów przewyższał nawet o 2 log poziom wykazany w badaniach własnych. Natomiast w mięsie mrożonym poziomy te były zbliżone (23, 38).

Paciorkowcami kałowymi obciążonych było od 10% (HP z woj. wielkopolskiego) do 60% (CAM z woj. wielkopolskiego) próbek surowego mięsa i od 3,3% (CAA z woj. dolnośląskiego) do 53,3% (CAM z woj. wielkopolskiego) próbek mięsa mrożonego. Zanieczyszczenie zarówno surowego, jak i mrożonego mięsa ślimaków enterokokami było bardzo niskie (odpowiednio: 0,3-2,0 i 0,48-2,11 log jtk/g) i nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w liczbie wymienionych bakterii między oboma rodzajami mięsa w obrębie województw. Z jednym wyjątkiem (surowe i mrożone mięso CAM z obu województw) różnic takich nie odnotowano także w analizie związanej z miejscem pozyskania ślimaków. Wysokie zanieczyszczenie enterokokami, sięgające 3,9 log jtk/g stwierdzono w próbkach gleby z poletek parku hodowlanego fermy w woj. wielkopolskim (praca nr 3). Przewyższało ono o prawie 2 log poziom enterokoków w najbardziej obciążonym tymi drobnoustrojami surowym mięsie CAM pochodzącego

z tej fermy. Charakterystyczny był wzrost zanieczyszczenia enterokokami mięsa mrożonego wszystkich gatunków ślimaków, bez względu na miejsce ich pozyskania. Mimo braku statystycznie istotnych różnic w poziomie zanieczyszczenia może to wskazywać na możliwość wtórnej kontaminacji na etapie chłodzenia, sortowania lub/i pakowania gotowanego mięsa. W większości danych piśmiennictwa stwierdzany poziom zanieczyszczenia enterokokami surowego mięsa ślimaków był zdecydowanie wyższy i w zależności od gatunku i miejsca pozyskania mieścił się w przedziale od 2,55 do 5,45 log jtk/g (19, 23).

Stwierdzono podobny odsetek zanieczyszczonych gronkowcami próbek mięsa surowego i mrożonego, który wynosił odpowiednio od 50% (HP z woj. wielkopolskiego) do 86,7% (CAA z woj. dolnośląskiego) oraz od 50% (HP z woj. wielkopolskiego) do 100% (CAA i CAM z woj. wielkopolskiego oraz CAM z woj. dolnośląskiego) próbek. Zanieczyszczenie ilościowe kształtowało się również na podobnym poziomie. W przypadku mięsa surowego mieściło się w przedziale od 1,48 (HP z woj. wielkopolskiego) do 2,84 log jtk/g (CAM z woj. dolnośląskiego), natomiast w mięsie mrożonym od 1,89 (HP z woj. wielkopolskiego) do 3,28 log jtk/g (CAM z woj. wielkopolskiego). W analizie zanieczyszczenia surowego i mrożonego mięsa ślimaków statystycznie istotne różnice w liczbie tych bakterii między wymienionymi rodzajami mięsa odnotowano tylko mięsie ślimaków hodowlanych z fermy w woj. wielkopolskim. Najwyższe zanieczyszczenie gronkowcami odnotowano w surowym i mrożonym mięsie ślimaka szarego dużego z pozyskanego z obu ferm. Wynosiło ono odpowiednio 2,84 i 3,07 log jtk/g w przypadku CAM z woj. dolnośląskiego i 2,5 i 3,28 log jtk/g przypadku CAM z woj. wielkopolskiego. Stwierdzono natomiast wzrost zanieczyszczenia gronkowcami (statystycznie istotny jedynie w mięsie ślimaków z fermy w woj. wielkopolskim) mrożonego mięsa wszystkich gatunków ślimaków bez względu na miejsce ich pozyskania. Podobnie jak w przypadku enterokoków może to wskazywać na możliwość wtórnego zanieczyszczenia mięsa po obróbce termicznej. Dane piśmiennictwa dają obraz dużej zmienności (od 1,1 przez 2,7-3,9 aż do ponad 7 log jtk/g) poziomu zanieczyszczenia gronkowcami surowego mięsa w zależności od miejsca pozyskania i gatunku ślimaka (20, 40) oraz zdecydowanie niższy (0,83 log jtk/g) niż stwierdzony w badaniach własnych poziom zanieczyszczenia mięsa mrożonego (38).

Bakteriami z rodzaju *Pseudomonas* zanieczyszczonych było od 63,3% do 96,7% próbek mięsa surowego i mrożonego. Ilościowe zanieczyszczenie surowego mięsa tymi

drobnoustrojami wynosiło od 2,22 (HP z woj. wielkopolskiego) do 4,15 log jtk/g (CAA z fermy w woj. wielkopolskim), a mięsa mrożonego od 1,12 (CAM z fermy w woj. wielkopolskim) do 2,21 log jtk/g (HP z woj. dolnośląskiego). W większości przypadków (wyjątkiem było najbardziej zanieczyszczone mięso CAA woj. wielkopolskiego) nie stwierdzono istotnych różnic między poziomem zanieczyszczenia wymienionymi bakteriami surowego i mrożonego mięsa pozyskanego od poszczególnych gatunków ślimaków. Obróbka termiczna redukowała liczbę bakterii rodzaju *Pseudomonas*, jednak statystycznie istotny spadek odnotowano tylko w mięsie ślimaków hodowlanych. Inni autorzy izolowali *Pseudomonas spp.* z surowego mięsa z różną, ale niższą (3,8-12,5% badanych próbek) niż stwierdzona w badaniach własnych częstotliwością, uzależnioną od gatunku i miejsca pochodzenia ślimaków (6, 19). Wyższy poziom zanieczyszczenia bakteriami z rodzaju *Pseudomonas* wynoszący od 4,0 do ponad 6 log jtk/g stwierdzono w surowym mięsie afrykańskich ślimaków olbrzymich, a między badanymi gatunkami ślimaków wykazano istotne różnice w poziomie zanieczyszczenia (20).

Bakterie z rodzaju *Aeromonas* stwierdzałem w mięsie surowym i mrożonym z podobną częstotliwością wahającą się w zakresie od 56,7% (46,7% w mięsie mrożonym) do 100 % badanych próbek. W analizie zanieczyszczenia w większości przypadków nie stwierdziłem statystycznie istotnych różnic w liczbie wymienionych bakterii między mięsem pozyskanym od różnych gatunków. Najbardziej zanieczyszczone wymienionymi drobnoustrojami (4,73 log jtk/g) było surowe mięso CAA z woj. wielkopolskiego, a zanieczyszczenie to przewyższało istotnie zanieczyszczenia surowego mięsa CAA z woj. dolnośląskiego. Obróbka termiczna spowodowała istotne obniżenie liczby bakterii z rodzaju *Aeromonas* w mięsie pozyskanym od każdego gatunku ślimaka z każdego województwa, a statystycznie istotne różnice w liczbie wymienionych bakterii między mięsem surowym a mrożonym nie pojawiły się tylko u ślimaków hodowlanych z fermy w woj. dolnośląskim. Ze względu na oportunistyczny charakter i enterotoksynogenność, bakterie z rodzaju *Aeromonas* znajdują się w kręgu zainteresowania badaczy już od lat osiemdziesiątych XX w. (cit. 21). *Aeromonas spp.* są stałym elementem mikroflory przewodu pokarmowego ślimaków, stąd też treść przewodu pokarmowego należy traktować jako pierwotne źródło zanieczyszczenia mięsa. Wyniki badań przewodu pokarmowego ślimaków *Achatina achatina* wykazały obecność *Aeromonas spp.* w 71,8%

przebadanych próbek (21). Drobnoustroje te stwierdzono u 28-29% ślimaków badanych w Nigerii i 6,25% jadalnych ślimaków w Indiach (cit. 12).

Odsetek próbek zanieczyszczonych drobnoustrojami psychrotrofowymi kształtował się na podobnym poziomie w obu rodzajach mięsa ślimaków i wynosił od 90% do 100%. Poziom zanieczyszczenia surowego i mrożonego mięsa winniczków był istotnie niższy w porównaniu do mięsa ślimaków hodowlanych. Istotnych zależności nie stwierdzono w liczbie tych bakterii w mięsie ślimaków hodowlanych w obrębie poszczególnych ferm. W przypadku ślimaków hodowlanych wykazano jednak, że miejsce pozyskania miało wpływ na zanieczyszczenie mięsa surowego, które było istotnie wyższe w najbardziej obciążonym psychrotrofami (powyżej 5 log jtk/g) mięsie pozyskanym ze ślimaków z fermy w woj. wielkopolskim. Takiej zależności nie stwierdzono w mięsie winniczków. Nieliczne dane piśmiennictwa wskazują na podobny poziom zanieczyszczenia psychrotrofami mięsa winniczków (3,3 log jtk/g) i zdecydowanie niższy mięsa CAA (2,4 log jtk/g) (40, 41).

Drobnoustroje proteolityczne stwierdzano z różną częstotliwością w surowym i mrożonym mięsie ślimaków. Odsetek zanieczyszczonych próbek wahał się od 36,7% do 93,3% w mięsie surowym oraz od 80% do 100% w mięsie mrożonym. Poziom zanieczyszczenia surowego mięsa winniczków drobnoustrojami proteolitycznymi był istotnie niższy (nawet o ponad 2 log) w porównaniu do mięsa ślimaków hodowlanych, jednak w mięsie mrożonym różnice nie były tak jednoznaczne. Najwyższym zanieczyszczeniem wynoszącym odpowiednio 4,90 i 4,44 log jtk/g charakteryzowało się surowe i mrożone mięso CAM z fermy w woj. wielkopolskim. Jednocześnie tylko w mięsie *H. pomatia* stwierdzono statystycznie istotny wzrost zanieczyszczenia bakteriami proteolitycznymi w mięsie mrożonym. W przypadku mięsa ślimaków hodowlanych zmiana liczby drobnoustrojów proteolitycznych miała odwrotny kierunek, ale z reguły spadek liczby tych drobnoustrojów nie był statystycznie istotny. W większości przypadków nie stwierdzono również statystycznie istotnych różnic w poziomie zanieczyszczenia obu rodzajów mięsa między województwami.

Surowe mięso ślimaków charakteryzuje się dość wysokim poziomem ogólnego zanieczyszczenia bakteriynego. Gatunek ślimaka i miejsce jego pozyskania często w istotny sposób determinują poziom zanieczyszczenia, który w mięsie ślimaków hodowlanych jest wyższy niż w mięsie winniczków, a najwyższym zanieczyszczeniem cechuje się mięso *C. a. maxima*. Spośród oznaczanych grup mikroorganizmów największy udział w zanieczyszczeniu bakteriynym tego mięsa miały drobnoustroje

psychrotrofowe oraz z rodziny *Enterobacteriaceae* (odpowiednio, nawet do 15% i 10,6% ogólnej liczby bakterii), a najmniejszy enterokoki, z udziałem nie przekraczającym 0,02%. Obróbka termiczna obniżała liczbę większości bakterii występujących w surowym mięsie. Największy statystycznie istotny spadek zanieczyszczenia dotyczył liczby drobnoustrojów z rodziny *Enterobacteriaceae* (poziom redukcji wahał się 1,3 log aż do ponad 4 log), następnie bakterii z rodzaju *Aeromonas* (od 1,7 log do ponad 3 log) i *Pseudomonas* (od 1,1 log do ponad 2 log) oraz ogólnej liczby bakterii tlenowych (od 0,1 do 1,2 log). Wzrost liczby gronkowców i enterokoków w mięsie mrożonym wskazuje na możliwość wtórnego zanieczyszczenia mięsa poddanego obróbce termicznej. Stąd też koniecznym warunkiem otrzymywania bezpiecznego i trwałego produktu jest bezwzględne przestrzeganie przez personel odpowiednich procedur dotyczących higieny dłoni i prawidłowego obchodzenia się z żywnością w trakcie produkcji.

**Udoskonalenie znormalizowanej metody izolacji i koncentracji wirusów
(ISO/TS 15216–2:2013) dla potrzeb badania jadalnych tkanek ślimaków
(praca nr 2)**

Potwierdzenie lub wykluczenie występowania w żywności zagrożeń mikrobiologicznych, w tym również chorobotwórczych dla człowieka wirusów, stwarza potrzebę posługiwania się odpowiednio dobranymi metodami analiz laboratoryjnych. Spośród opisanych metod ekstrakcji i koncentracji wirusów z tkanek mięczaków tylko jedna została uznana za standard międzynarodowy i zatwierdzona jako norma ISO/TS 15216-2:2013 (13). Umożliwia ona wydajną ekstrakcję wirusów z małży, ale jej skuteczność przy ekstrakcji wirusów z innych gatunków mięczaków, np. ślimaków, nigdy nie została potwierdzona. W prezentowanych badaniach zaadaptowano i udoskonalono metodę ekstrakcji i koncentracji wirusów opisaną w ISO/TS 15216-2:2013 w taki sposób, aby była odpowiednia do badania jadalnych tkanek ślimaków w kierunku obecności wirusów przewodu pokarmowego człowieka. Materiałem do analiz były wątrobo-trzustki pozyskane od trzech gatunków ślimaków, tj. winniczka (*H. pomatia*) i ślimaka szarego dużego (*C. a. maxima*; oba gatunki z woj. wielkopolskiego i dolnośląskiego) oraz ślimaka małego szarego (*C. a. aspersum*; z woj. wielkopolskiego i warmińsko-mazurskiego). Winniczki pochodziły ze zbiorów dokonywanych w środowisku naturalnym, a ślimaki z rodzaju *Cornu* z ferm stosujących mieszany system hodowli. Łącznie przebadano 60 próbek ślimaków. Ekstrakcję

i koncentrację wirusowego RNA ze ślimaków przeprowadzono według protokołu ISO/TS, do którego wprowadzono następujące modyfikacje: a) zastosowano dziesięciokrotnie niższe (0,3 U/ml) stężenie proteinazy K i zoptymalizowano warunki enzymatycznego trawienia próbek, b) homogenizację wątrobo-trzustek przeprowadzono z użyciem buforu zawierającego proteinazę K, zwiększając jednocześnie ilość buforu lizującego, co umożliwiło badanie większej objętości próbki i c) dwukrotnie (z 50 do 100 μ l) zwiększono objętość kuleczek magnetycznych używanych do izolacji wirusowego RNA, aby podnieść wydajność odzysku kwasów nukleinowych. Do optymalizacji metody i oceny stopnia odzysku wirusa z tkanek ślimaków zastosowano norowirus myszy (wirus modelowy; MNoV-1), używany również jako kontrola dodatnia poszczególnych etapów analiz w badaniach wirusologicznych żywności. Uzyskany z próbek mięczaków roztwór kwasów nukleinowych badano w kierunku obecności RNA MNoV-1 z wykorzystaniem jednoetapowej łańcuchowej reakcji polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym (real-time RT-PCR) używając aparatu 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA). Stosowano startery opracowane przez Baert i wsp. (3) oraz mieszaninę reakcyjną i warunki opisane przez Maunula i wsp. (17). W proces molekularnej analizy włączono odpowiednie kontrole, tj. pozytywną i negatywną oraz kontrolę wewnętrzną amplifikacji (IAC – internal amplification control). Skuteczność zastosowanej metody oceniono na podstawie stopnia odzysku MNoV-1, którym zanieczyszczano badane próbki. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie metodą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) oraz określono przedziały ufności stosując test wielokrotnego rozstępu LSD (Multiple Range Tests). Obliczenia wykonano programem Statgraphics Centurion wersja XV (Statgraphics Technologies Inc., USA). Średni procentowy odzysk wirusa z tkanek *C. a. maxima* wyniósł 5,71% i był istotnie wyższy ($NIR_{0,05} = 3,22$) w porównaniu do odzysków uzyskanych dla *H. pomatia* (1,28%) i *C. a. aspersum* (0,31%). Statystycznie istotnych różnic nie stwierdzono między wartościami uzyskanymi dla *H. pomatia* i *C. a. aspersum*. Niemniej jednak, średni odzysk wirusa kontrolnego z wątrobo-trzustki winniczka przekroczył zakładaną minimalną 1% wartość odzysku wirusa dla ocenianej metody, aby uznać ją za przydatną do badań wirusologicznych. Jedynie w przypadku *C. a. aspersum* zakładana wartość nie została osiągnięta. Dla każdego gatunku ślimaka wyznaczono również dolną i górną granicę przedziału ufności dla uzyskanych wartości odzysku wirusa, które dla ślimaka szarego dużego mieściły się w zakresie od 4,1% do 7,3%, dla winniczka od -0,3%

do 2,9%, a dla ślimaka szarego małego w zakresie od -1,3% do 1,9%. Analizując zakresy przedziałów ufności dla średnich odzysku wirusa, można przyjąć że próg odzysku powyżej 1% będzie zawsze osiągnięty w przypadku badania tkanek *C. a. maxima*. Jednoprocentowy próg odzysku wirusa będzie możliwy dla ponad połowy badanych wątrobo-trzustek winniczków, a w przypadku *C. a. aspersum* odzysk na poziomie 1% i większym zostanie uzyskany tylko sporadycznie. Podobnie jak inne metody wykorzystywane do ekstrakcji i koncentracji wirusów z żywności, również i udoskonalona metoda składa się z kilku etapów, które umożliwiają uwolnienie (ekstrakcję) wirusów z próbki, a następnie ich koncentrację w małej, odpowiedniej do analiz molekularnych objętości ekstraktu. Ze względu na bardzo ważną rolę jaką w procesie trawienia pokarmu u mięczaków pełni wątrobo-trzustka, większość protokołów dotyczących ekstrakcji wirusów, w tym ISO/TS, zaleca homogenizację tego narządu zamiast całego ciała mięczaka. Uwzględniając fakt przynależności ślimaków i małży do jednego typu systematycznego, można było oczekiwać, że ta metoda w pełni nadaje się do ekstrakcji wirusów również z tkanek ślimaków. Jednak po kilku wstępnych doświadczeniach, w których zastosowano metodę ISO/TS do analizy próbek ślimaków, nie uzyskano zakładanego minimalnego 1% poziomu odzysku wirusa. Wydajność ekstrakcji nie przekraczała 0,1% dla *C. a. maxima* i *H. pomatia*. Trawienie próbki proteinazą K uznano za ważny etap metody, a zalecana koncentracja enzymu (3 U/ml) wpływała negatywnie na odzysk MNoV-1, który zmniejszył się do 3,1% w porównaniu do próbki kontrolnej. Aby uniknąć degradacji cząstek wirusa, która miała miejsce w trakcie procesu ekstrakcji, do dalszej analizy użyto dziesięciokrotnie niższego stężenia enzymu. Mniejsza ilość proteinazy K okazała się wystarczająca do trawienia próbki bez szkodliwego oddziaływania na wirusa, którego odzysk wzrósł do 95,9%. Chociaż wysokie pH ułatwia uwalnianie wirusów z małży, nie było ono skuteczne w przypadku analizy tkanek ślimaków, ponieważ odzysk wirusa nadal był niski i nie przekraczał 0,1%. Dlatego też obniżono pH próbki przed trawieniem proteinazą K do 3,5, co doprowadziło do zwiększenia odzysku w zakresie od 0,1% do 34%. W pewnym stopniu może to być związane ze zmniejszoną aktywnością enzymu przy niskim pH, co minimalizuje dalszą inaktywację wirusa w roztworze. Ogólna niska wydajność ekstrakcji opisywanej metody może również wynikać z bardziej rygorystycznego sposobu obliczania odzysku wirusa w porównaniu do standardu ISO/TS. Udoskonalona metoda ekstrakcji i koncentracji wirusów z jadalnych tkanek ślimaków nie skomplikowała istniejącej już procedury, ani nie

zwiększyła jej czaso- i pracochłonności. Metoda została z powodzeniem wykorzystana do wykrywania wirusów w tkankach *C. a. maxima* i winniczków oraz w mniejszym, w próbkach ślimaków z gatunku *C. a. aspersum*. Pomimo pewnych niedoskonałości, może ona być stosowana w badaniach monitoringowych jadalnych tkanek ślimaków lądowych w kierunku obecności zanieczyszczeń wirusowych.

Ocena możliwości zanieczyszczenia jadalnych tkanek ślimaków pozyskiwanych w Polsce pochodzącymi ze środowiska chorobotwórczymi dla człowieka wirusami przenoszonymi drogą pokarmową

(praca nr 2 i 3)

Jednym z potencjalnych zagrożeń mikrobiologicznych związanych z konsumpcją ślimaków są chorobotwórcze dla człowieka wirusy przenoszone drogą pokarmową, w tym wirusy zakaźnego zapalenia wątroby typu A i E (HAV i HEV) oraz ludzkie adenowirusy (hAdV) i norowirusy genotypu I i II (NoV GI i GII). W 2016 r. w UE w 91 udokumentowanych ogniskach masowych zatruc pokarmowych na tle norowirusów aż w 36 (40%) wektorem wirusów były skorupiaki i mięczaki (10). Odwrotnie niż w przypadku małży, w dostępnym piśmiennictwie brakuje danych na temat obecności wymienionych patogenów w jadalnych tkankach ślimaków lądowych i ich transmisji poprzez konsumpcję tych tkanek. Odnotowano jednak doniesienia o ostrych wirusowych zapaleniach żołądka i jelit u ludzi po spożyciu surowych ślimaków morskich (*Umbonium giganteum*), a w 59,3% z 27 przebadanych ślimaków znaleziono norowirusy i sapowirusy (22). Ze względu na występowanie HAV, HEV, hAdV i NoV w środowisku, a także znajomość istniejących dróg i mechanizmów ich rozprzestrzeniania się istnieje duże prawdopodobieństwo obecności wymienionych wirusów w jadalnych tkankach ślimaków lądowych. Celem badań opisanych w pracy nr 3 było rozpoznanie ewentualnej obecności chorobotwórczych dla człowieka wirusów w hodowlanych i wolno żyjących ślimakach jadalnych oraz wskazanie potencjalnego źródła zanieczyszczenia wirusami w najbardziej rozpowszechnionym w Polsce systemie hodowli ślimaków. Materiał do badań był tożsamy z opisanym w podrozdziale pierwszym, dotyczącym patogenów bakteryjnych. Łącznie przebadano 240 próbek. W tej liczbie 60 próbek stanowiły pojedyncze ślimaki (po 10 z każdego gatunku z każdego województwa) wykorzystane do badań w kierunku obecności chorobotwórczych wirusów, a 180 przeznaczone do badań bakteriologicznych próbki surowego mięsa (po 30 w obrębie każdego gatunku

z każdego województwa) pobrane w sposób opisany w pracy nr 4. Dodatkowo analizie bakteriologicznej poddano 8 pulowanych próbek ziemi pobranych z różnych etapów cyklu produkcyjnego w gospodarstwie stosującym mieszany system hodowli obu gatunków ślimaków z rodzaju *Cornu*. Próbki ziemi reprezentowały etap reprodukcji (2 próbki świeżej ziemi z kopalni i 2 tej samej ziemi po przeparowaniu), tuczu wstępnego (2 próbki gleby z tunelu foliowego) i tuczu właściwego (2 próbki gleby z poletek parku hodowlanego). Ponadto w celu wskazania potencjalnego źródła zanieczyszczenia ślimaków chorobotwórczymi wirusami przeprowadzono wizję lokalną i dokonano przeglądu systemu zarządzania jakością w wymienionym gospodarstwie. Molekularnemu badaniu na obecność HAV, HEV, hAdV i NoV (GI i GII) poddano wypreparowane ze ślimaków wątrobo-trzustki. Ekstrakcję i koncentrację wirusowego RNA z materiału badawczego przeprowadzono według ulepszonej międzynarodowej metody ISO/TS, której zasady opisano w poprzednim podrozdziale dotyczącym pracy nr 2. Uzyskane ekstrakty kwasów nukleinowych poddawano badaniu w kierunku obecności wirusowego materiału genetycznego. Do wykrywania HAV, HEV, NoV (GI i GII) i norowirusa myszy (MNoV-1; wzorcowy wirus kontroli procesu – a sample process control virus - SPCV) wykorzystano jednoetapową łańcuchową reakcję polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym (real-time RT-PCR). Natomiast w przypadku hAdV wykorzystano reakcję real-time PCR w formacie duplex (duplex real-time RT-PCR). Stosowano startery, sekwencje sondy, mieszaninę reakcyjną i warunki opisane przez Maunula i wsp. (17). Wszystkie reakcje przeprowadzono w systemie 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). W proces molekularnej analizy włączono kontrole opisane w poprzednim podrozdziale (praca nr 2). Status mikrobiologiczny surowego mięsa ślimaków oraz ziemi w gospodarstwie określono w oparciu o oznaczenie ogólnej liczby bakterii tlenowych, liczby enterokoków i bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. Oznaczenia przeprowadzono według odpowiednich Polskich Norm (25, 29, 33). Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej metodami opisanymi w drugim podrozdziale (praca nr 5). W żadnym z przebadanych ślimaków nie stwierdzono chorobotwórczych dla człowieka wirusów. Trzeba mieć jednak na uwadze, że ujemny wynik badania może również wynikać z niskiej częstości występowania wirusa w środowisku życia ślimaków lub z poziomu zanieczyszczenia poniżej granicy wykrywalności metody. Warunek posługiwania się właściwą procedurą z odpowiednim zestawem kontroli wydajności ekstrakcji i detekcji wirusów w omawianym badaniu został spełniony.

Średni procentowy odzysk wirusa wahał się między 0,3% dla *C. a. aspersum* a 5,7% dla *C. a. maxima* (praca nr 2). Mimo braku danych na temat transmisji chorobotwórczych wirusów poprzez spożycie mięsa ślimaków, pewne podobieństwa między małżami a ślimakami (np. wysoka wilgotność środowiska życia, wzrost lub pozyskiwanie ze środowiska naturalnego, gromadzenie się zanieczyszczeń w wątrobo-trzustce) sugerują, że ślimaki mogą być podatne na kontaminację wirusami. Poza tym produkcja pierwotna jest najbardziej narażonym na zanieczyszczenia mikrobiologiczne etapem w całym łańcuchu żywnościowym. Z tego powodu cały proces hodowli ślimaków został poddany przeglądowi pod kątem znalezienia krytycznych miejsc w łańcuchu żywnościowym, w których mogłyby dojść do zanieczyszczenia wirusami. W trakcie przeprowadzonej na fermie wizji lokalnej potwierdzono: a) dobrą jakość używanej do produkcji wody, która pochodziła z wodociągu publicznego i spełniała chemiczne i mikrobiologiczne kryteria dla wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi, b) brak możliwości zanieczyszczenia ślimaków w trakcie cyklu produkcyjnego przez wody spływające z pól uprawnych, wylanie rzeki czy odprowadzenie ścieków, c) brak w bezpośrednim sąsiedztwie fermy upraw rolnych, zakładów przemysłowych, oczyszczalni ścieków i składowisk odpadów, d) prawidłowy stan ogrodzenia i innych zabezpieczeń (siatki) chroniących ślimaki przed dostępem zwierząt wolno żyjących, e) używanie przez personel rękawiczek na etapie zbioru i transportu ślimaków w celu zminimalizowania możliwości zanieczyszczenia krzyżowego i f) prawidłowość przeprowadzanych zabiegów agrotechnicznych w tunelach foliowych i na poletkach parku po zakończeniu zbioru ślimaków. W przypadku winniczków nie można było wykluczyć potencjalnego zanieczyszczenia wirusami naturalnych siedlisk, z których je pozyskiwano. Jednak ujemny wynik badania wirusologicznego oznacza, że nawet jeśli pochodziły z potencjalnie zanieczyszczonego środowiska nie stanowiły zagrożenia dla zdrowia konsumentów. Wyniki badania mikrobiologicznego próbek ziemi z fermy i surowego mięsa ślimaków pozwoliły lepiej poznać warunki higieniczne w cyklu produkcyjnym ślimaków. Ogólne zanieczyszczenie bakteryjne próbek parowanej i nieparowanej ziemi z mieściło się w przedziale ustalonym dla ziemi czystej i umiarkowanie zanieczyszczonej ($\leq 6,4 \log \text{ jtk/g}$) (44). Natomiast zanieczyszczenie mikrobiologiczne próbek gleby z tuneli foliowych i parku było zdecydowanie wyższe i mieściło się odpowiednio w przedziałach odpowiadających ziemi zanieczyszczonej ($> 6,6 \log \text{ cfu/g}$) i silnie zanieczyszczonej ($> 7,0 \log \text{ cfu/g}$). Stwierdzono powszechne występowanie bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* we wszystkich próbkach badanej

ziemi. Natomiast enterokoki wyizolowano jedynie z ziemi pochodzącej z poletek parku. Źródła zanieczyszczenia nie rozpoznano, ale może być to związane z możliwością dostępu do działek wolno żyjących zwierząt - w szczególności ptaków, gryzoni i owadów, jak również bardzo dużym zagęszczeniem ślimaków w parku hodowlanym. Ogólne zanieczyszczenie bakteriami tlenowymi surowego mięsa *C. a. maxima* i *C. a. aspersum* z poddanemu przeglądowi gospodarstwa wynosiło, odpowiednio, 6,6 i 6,0 log jtk/g, bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae* odpowiednio 3,9 i 4,8 log jtk/g, a enterokokami odpowiednio 2,0 i 0,4 log jtk/g. Stan mikrobiologiczny surowego mięsa ślimaków wskazuje na dobrą higienę i odpowiednie warunki środowiskowe w gospodarstwie, w którym były utrzymywane. Analizę zanieczyszczenia wymienionymi bakteriami surowego mięsa w relacji do zanieczyszczenia ziemi zawarto w drugim podrozdziale (praca nr 5). Należy stwierdzić, że brak obecności wirusów i dobra jakość mikrobiologiczna mięsa ślimaków wynikała z wdrożonych w gospodarstwie programów GMP/GHP oraz praktyk zarządzania bezpieczeństwem żywności. Mimo stosunkowo niewielkiej liczby przebadanych ślimaków pozyskano cenne dane na temat statusu mikrobiologicznego ślimaków na etapie produkcji pierwotnej. Dokonany przegląd dobrych praktyk stosowanych w helikulturze potwierdził skuteczność środków zapobiegawczych i kontrolnych używanych w pozyskiwaniu żywności wolnej od chorobotwórczych wirusów. Wykorzystywanie na etapie reprodukcji ziemi o wysokiej jakości mikrobiologicznej, zapewnienie odpowiednich warunków podczas reprodukcji, dobre warunki środowiskowe zapewnione młodym ślimakom na etapie tuczu wstępnego, stosowanie wody dobrej jakości, efektywne systemy zabezpieczeń i regularne szkolenia personelu były najważniejszymi działaniami w tym obszarze. Strategia ta okazała się wystarczająca w zmniejszaniu zagrożenia mikrobiologicznego i w zapobieganiu kontaminacji ślimaków wirusami. Badania dowiodły, że ryzyko zakażenia wirusami przenoszonymi przez żywność po spożyciu ślimaków i produktów ze ślimaków można uznać za znikome.

Wyniki omówionych badań dotyczących możliwości zanieczyszczenia wirusami jadalnych tkanek ślimaków przedstawiono również w formie doniesienia konferencyjnego - zał. Nr 4, pkt B poz. 26.

Podsumowanie

Reasumując należy stwierdzić, że za najważniejsze osiągnięcia przeprowadzonych przeze mnie badań należy uznać:

- wykonaną po raz pierwszy w Polsce kompleksową mikrobiologiczną analizę jakościową i ilościową mięsa ślimaków opartą na badaniu bardzo dużej liczby próbek reprezentujących trzy najważniejsze gatunki ślimaków jadalnych pozyskanych z różnych lokalizacji,
- ulepszenie znormalizowanej metody izolacji i koncentracji wirusów (ISO/TS 15216–2:2013), którą następnie z powodzeniem wykorzystano w podjętych po raz pierwszy w Polsce badaniach dotyczących obecności w jadalnych tkankach ślimaków chorobotwórczych dla człowieka wirusów przenoszonych drogą pokarmową; ulepszona metoda umożliwiła skuteczną ekstrakcję różnych wirusów przenoszonych przez jadalne tkanki ślimaków bez dodatkowych (w stosunku do standardu ISO/TS) nakładów czasu i pracy przy jej stosowaniu,
- wykluczenie zanieczyszczenia jadalnych tkanek ślimaków wirusami zakaźnego zapalenia wątroby typu A i E, ludzkimi adenowirusami i norowirusami oraz wykazanie znikomego ryzyka zakażenia tymi wirusami po spożyciu ślimaków i produktów ze ślimaków,
- wskazanie *L. monocytogenes* jako najważniejszego zagrożenia mikrobiologicznego w surowym mięsie ślimaków,
- wykluczenie obecności *Salmonella spp.* i *E. coli* w surowym mięsie, a przez to potwierdzenie dobrego statusu higienicznego środowiska naturalnego i hodowlanego, z których pozyskano ślimaki,
- wykazanie dobrej jakości mikrobiologicznej surowego i mrożonego mięsa ślimaków,
- wykazanie, że gatunek oraz miejsce pozyskania ślimaków mają wpływ na poziom zanieczyszczenia mikroflorą bakteryjną surowego mięsa; najwyższe zanieczyszczenie w obrębie każdej (z wyj. *Aeromonas sp.*) badanej grupy bakterii wykazywało mięso pozyskane od *C. a. maxima*, najniższe (w zdecydowanej większości przypadków) mięso winniczków; dodatkowo w zakresie ogólnego zanieczyszczenia drobnoustrojami tlenowymi istotne różnice w liczbie bakterii dotyczyły każdego z gatunków ślimaków w porównaniu między województwami,
- potwierdzenie prawidłowości procesu obróbki termicznej surowego mięsa ślimaków na podstawie wykluczenia obecności patogenów bakteryjnych oraz znacznej redukcji

poziomu zanieczyszczenia mikrobiologicznego w mięsie mrożonym (od 0,1 do ponad 4 log w zależności od analizowanej grupy bakterii),

- wskazanie krytycznego punktu w technologicznym procesie produkcji mięsa ślimaków, jakim są wykonywane ręcznie czynności klasyfikowania i pakowania ugotowanego mięsa, skutkujące wzrostem poziomu zanieczyszczenia mięsa gronkowcami (w tym koagulazododatnimi) i enterokokami; stąd konieczność bardziej rygorystycznych kontroli przestrzegania przez personel instrukcji dotyczących tak higieny dłoni, jak i innych zabezpieczeń przed wtórnym zanieczyszczeniem finalnego produktu,

- potwierdzenie skuteczności środków zapobiegawczych i kontrolnych stosowanych w helikulturze w ramach dobrych praktyk w wykluczaniu obecności patogenów bakteryjnych i wirusowych w mięsie ślimaków.

Piśmiennictwo

1. Adegoke A. A., Bukola A-T. C, Comfort I. U., Olainka A. A., Amos K. O.: Snails as meat source: Epidemiological and nutritional perspectives. *J. Microbiol. Antymicrob.* 2010, 2, 001-005.
2. Andrews W. H., Wilson C. R., Romero A., Poelma P. L.: The Moroccan Food Snail, *Helix aspersa*, as a source of *Salmonella*. *Appl. Microbiol.* 1975, 29, 328-330.
3. Baert L., Wobus C.E., Van Coillie E., Thackray L.B., Debevere J., Uyttendaele M: Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription- PCR before and after heat exposure. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, 74:543–546; doi:10.1128/AEM.01039-07.
4. Barker G.M. (red.): *The Biology of Terrestrial Molluscs*. Chapter 6: Food and feeding behaviour. CABI Publishing Wallingford, Oxon 2001, 259-288.
5. Burbianka M., Pliszka A., Burzyńska H.: *Mikrobiologia żywności*. PZWL Warszawa 1983, s. 274-275 i 465.
6. Cicero A., Giangrosso G., Cammilleri G., Macaluso A., Currò V., Galuppo L., Vargetto D., Vicari D., Ferrantelli V.: Microbiological and chemical analysis of land snails commercialised in Sicily. *Ital. J. Food Safety* 2015, 4:4196, 66-68; doi: [10.4081/ijfs.2015.4196](https://doi.org/10.4081/ijfs.2015.4196).
7. Corda A., Mara L., Virgilio S., Pisanu M., Chessa G., Parisi A., Cogoni M.P.: Microbiological and chemical evaluation of *Helix* spp. snails from local and non EU-markets, utilised as food in Sardinia. *Ital. J. Food Safety* 2014, 3, 69-72; doi:<http://dx.doi.org/10.4081/ijfs.2014.1732>.
8. Dufour A.P., Strickland, E.R., Cabelli, V.J.: Membrane filter method for enumerating *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1981, 41, 1152-1158.
9. Dyrektywa Rady nr 2006/88/WE z dn. 24 października 2006 r. w sprawie wymogów w zakresie zdrowia zwierząt akwakultury i produktów akwakultury oraz zapobiegania niektórym chorobom zwierząt wodnych i zwalczania tych chorób – Dz. U. L 328 z dn. 24.11.2006 r., s. 14.
10. EFSA/ECDC: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal* 2017;15(12):5077; doi:10.2903/j.efsa.2017.5077.
11. Fernández-Armesto F.: *Near a Thousand Tables: A History of Food*. The Free Press, New York 2002, s. 56.

12. Igbinosa I. H., Igumbor E. U., Aghdasi F., Tom M., Okoh A. I.: Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. *Sci. World J.* 2012; Article ID 625023; doi:10.1100/2012/625023.
13. ISO/TS 15216-2:2013 Microbiology of food and animals feed – Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - part 2: Method for qualitative detection.
14. Kirkan S., Göksoy E. Ö., Kaya O.: Detection of *Listeria monocytogenes* by using PCR in *Helix pomatia*. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2006, 30, 375-380.
15. Lubell D.: Prehistoric edible land snails in the circum-Mediterranean: the archaeological evidence. *Petits Animaux et Societes Humaines. Du Complement Alimentaire Aux Ressources Utilitaires. Actes des XXIV^e rencontres internationales d'archéologie et d'histoire d'Antibes.* Sous la direction de J.-P. Brugal et J. Desse, Éditions APDCA, Antibes 2004, 77–98.
16. Łysak A.: “Helikultura – ślimak w wychowie fermowym”, *Materiały konferencji naukowej: Badania zakończone w Instytucie Zootechniki w 1998 r.*; Balice. Wyd. własne IZ, Kraków 1999, 7-11.
17. Maunula L., Kaupke A., Vasickova P., Söderberg K., Kozyra I., Lazic S., van der Poel W. H., Bouwknegt M., Rutjes S., Willems K.A, Moloney R., D'Agostino M., de Roda Husman A.M., von Bonsdorff C. H., Rzeżutka A., Pavlik I., Petrovic T., Cook N.: Tracing enteric viruses in the European berry fruit supply chain. *Int. J. Food Microbiol.* 2013, 167, 177–185; doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.003.
18. Novakovic B., Grujic R.: Importance of adequate hand hygiene of food handlers in snails meat processing. *J. Hyg. Eng. Des.* 2017, 21, 23-28.
19. Nwiyi P., Amaechi N.: Prevalence of enteric bacteria isolates from aquarium snails (*Ampullaria spp.*) in Abia State, Nigeria. *Online J. Anim. Feed Res.* 2013, 3, 77-79.
20. Nyoagbe L.A, Appiah V., Nketsia-Tabiri J., Larbi D., Adjei I.: Evaluation of African giant snails (*Achatina* and *Archachatina*) obtained from markets (wild) and breeding farms. *Afr. J. Food Sci.* 2016, 10, 94-104; doi: 10.5897/AJFS2015.1320.
21. Obi S.K.C., Nzeako B.C.: *Salmonella*, *Arizona*, *Shigella* and *Aeromonas* isolated from the snail *Achatina achatina* in Nigeria. *Antonie van Leeuwenhoek* 1980, 46, 475-481.
22. Ozawa, H., Kumazaki, M., Ueki, S., Morita, M., Usuku, S.: Detection and genetic analysis of noroviruses and sapoviruses in sea snail. *Food and Environ. Virol.* 2015, 7, 325-332.
23. Parlapani F.F., Neofitou Ch., Bozariis I.S.: Microbiological quality of raw and processed wild and cultured edible snails. *J. Sci. Food Agric.* 2014, 94, 768–772.
24. Pin C., Marin M.L., Garcia M.L., Tormo J., Casas C.: Comparison of different media for the isolation and enumeration of *Aeromonas spp* in foods. *Lett. Appl. Microbiol.* 1994, 18, 190-192.
25. PN-A-82055-7:1997 Mięso i przetwory mięsne - Badania mikrobiologiczne - Wykrywanie obecności i oznaczanie liczby enterokoków.
26. PN-EN ISO 11290-1:1999 Mikrobiologia żywności i pasz – Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes* – Metoda wykrywania obecności
27. PN-EN ISO 6888-1:2001 Mikrobiologia żywności i pasz - Horyzontalna metoda oznaczania liczby gronkowców koagulazo-dodatnich (*Staphylococcus aureus* i innych gatunków) - Część 1: Metoda z zastosowaniem pożywki agarowej Baird-Parkera.
28. PN-EN ISO 6579:2003 Mikrobiologia żywności i pasz – Horyzontalna metoda wykrywania *Salmonella spp.*
29. PN-EN ISO 4833:2004 Mikrobiologia żywności i pasz - Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów - Metoda płytkowa w temperaturze 30 stopni C.
30. PN-EN ISO 13720:2010 Mięso i przetwory mięsne - Oznaczanie liczby przypuszczalnych *Pseudomonas sp.*
31. PN-ISO 16649-2:2004 Mikrobiologia żywności i pasz - Horyzontalna metoda oznaczania liczby beta-glukuronidazo-dodatnich *Escherichia coli* - Część 2: Metoda płytkowa w temperaturze 44 stopni C z zastosowaniem 5-bromo-4-chloro-3-indolilo beta-D-glukuronidu.

32. PN-ISO 17410:2004 Mikrobiologia żywności i pasz - Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów psychrotrofowych.
33. PN-ISO 21528-2:2005 Mikrobiologia żywności i pasz - Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Enterobacteriaceae* - Część 2: Metoda płytkowa.
34. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2073/2005 z dn. 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych – Dz. Urz. L 338 z 22.11.2005 r., s. 1.
35. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dn. 14 października 2008 r. w sprawie szczegółowych wymagań weterynaryjnych dla prowadzenia działalności w zakresie sektora akwakultury – Dz. U. z 2008 r. Nr 190, poz. 1167.
36. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dn. 16 grudnia 2016 r. w sprawie ochrony gatunkowej zwierząt – Dz. U. 2016 r., poz. 2183.
37. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 853/2004 z dn. 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego – Dz. Urz. L 139 z 30.04.2004 r., s. 55.
38. Temelli S., Dokuzulu C., Cem Sen M. K.: Determination of microbiological contamination sources during frozen snail meat processing stages. *Food Control* 2006, 17, 22-29.
39. Ustawa z dn. 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt i zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt – Dz. U. z 2017 r. poz. 1855.
40. Walczak Z., Czerwińska E.: Microbiological meat safety of edible snails (*Helix pomatia*) gathered from natural habitat. *Probl. Hig. Epidemiol.* 2013, 94, 853-856.
41. Walczak Z., Czerwińska E.: Ocena jakości mikrobiologicznej mięsa ślimaków (*Helix aspersa* Müller) po wstępnym przetworzeniu oraz jej zmiany w trakcie przechowywania zamrażalniczego. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 2011, 569, 285-292.
42. Warron M. T.: O gospodarstwie rolnym. Zakład Narodowy im. Ossolińskich, Wrocław 1991 (przekład, wstęp i komentarz Ireneusz Mikołajczyk).
43. Ziomek M., Szkucik K., Maćkowiak-Dryka M., Paszkiewicz W., Drozd Ł., Pyz-Łukasik R.: Wymagania weterynaryjne przy pozyskiwaniu i przetwarzaniu ślimaków jadalnych. *Med. Weter.* 2017, 73, 919-825.
44. Zmysłowska I. (red.): Mikrobiologia ogólna i środowiskowa: teoria i ćwiczenia. Wydawnictwo UWM Olsztyn 2009.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

A. Aktywność naukowa

Mój łączny dorobek naukowy liczy 50 publikacji (w tym 5 prac stanowiących jednotematyczny cykl publikacji składających się na osiągnięcie naukowe), z których 31 znajduje się w bazie JCR. W tej liczbie 14 prac jest wyłącznie mojego autorstwa, a w kolejnych 11 publikacjach jestem pierwszym autorem. Łączny *impact factor* publikacji wynosi 17,891, a ich sumaryczna punktacja według MNiSW - 589 pkt. Jestem również autorem i współautorem 32 doniesień prezentowanych na krajowych i zagranicznych konferencjach naukowych. W kręgu moich zainteresowań naukowych znajduje się szeroko rozumiana higiena żywności zwierzęcego pochodzenia. Szczegółową tematykę podejmowanych w tym zakresie badań przedstawię zgodnie z chronologicznym porządkiem ich realizacji:

1. Miopatie stresowe u zwierząt rzeźnych
2. Ścieki z zakładów mięsnych - ich negatywny wpływ na środowisko oraz możliwości ograniczenia tego wpływu
3. Prawodawstwo weterynaryjne, ze szczególnym uwzględnieniem prawa żywnościowego
4. Jakość mleka surowego i spożywczego w Polsce
5. Higiena procesu uboju zwierząt rzeźnych
6. Zmiany chorobowe i odchylenia jakościowe w badaniu sanitarno-weterynaryjnym zwierząt rzeźnych i innych wykorzystywanych do celów spożywczych gatunków zwierząt
7. Wartość odżywcza i status mikrobiologiczny tkanek mięśniowych ryb
8. Inne tematy badawcze.

ad 1.

Odchylenia jakościowe mięsa określane jako PSE (pale, soft, exudative - blade, miękkie, wodniste) oraz DFD (dark, firm, dry - ciemne, zbite, suche) stanowią istotny problem w hodowli zwierząt oraz dla przemysłu mięsnego. Występowanie miopatii stresowych u zwierząt rzeźnych jest konsekwencją ukierunkowania prac hodowlanych na wytworzenie wybitnie mięsnych ras zwierząt. Tendencja ta ujawniła się szczególnie wyraźnie w populacji świń. Takie ukierunkowanie wynikało ze zmieniających się zaleceń żywieniowych, a co za tym idzie również oczekiwań i przyzwyczajień konsumentów. Cel, którym było uzyskanie jak największej ilości chudego mięsa osiągnięto na drodze selekcji ras krajowych, przez wprowadzanie nowych ras i krzyżówki międzyrasowe. W trakcie prac hodowlanych mniejszą uwagę przywiązywano do cech jakościowych mięsa. Następstwem takiego podejścia tego było pojawienie się u ras uszlachetnionych szeregu wad konstytucjonalnych objawiających się zwiększonymi upadkami zwierząt w transporcie i większą liczbą zwierząt ubijanych z konieczności (wskutek przyżyciowo objawiającej się hipertermii złośliwej), a przede wszystkim stwierdzanym po uboju wyższym odsetkiem tusz z odchyleniami jakościowymi tkanki mięśniowej typu PSE lub DFD. Wynikało to głównie ze zwiększonej, utrwalonej genetycznie (współczynnik odziedziczalności $h^2=0,4$) podatności zwierząt na czynniki stresowe, u świni domowej związanej z mutacją, zlokalizowanego na 6 chromosomie, genu receptora rianodyny izoformy 1 (RYR1). Opracowania dotyczące występowania syndromów stresowych w krajowej populacji zwierząt rzeźnych dotyczyły najczęściej pojedynczych zakładów

mięsnych, ewentualnie województw. W związku z brakiem danych nt. częstości występowania wymienionych syndromów PSE i DFD u świń oraz bydła rzeźnego na terenie ówczesnego województwa lubelskiego podjąłem badania, których wyniki przedstawiłem w podanej niżej publikacji:

- **Paszkiewicz W., Prost E.:** Występowanie syndromów PSE i DFD u świń i bydła rzeźnego województwa lubelskiego. *Medycyna Wet.* 1992, 48, 409-411

oraz doniesieniu konferencyjnym - zał. nr 4 pkt B poz. 1.

Stwierdzony w opisanych badaniach wysoki odsetek tusz wieprzowych (66,5%) i wołowych (42,5%) obciążonych wadami PSE i DFD był przyczyną podjęcia badań w celu określenia rozprzestrzenienia genów stresowrażliwości w populacji świń w wybranej wielkotowarowej hodowli na terenie województwa lubelskiego. Podatność na stres i występujące w jego następstwie zmiany PSE i DFD u dorosłych świń mogą być stwierdzone już u kilkutygodniowych prosiąt przy pomocy tzw. testu halotanowego. Wrażliwość na halotan jest cechą dziedziczną, kontrolowaną przez geny jednego, autosomalnego locus. W teście halotanowym wykrywane są tylko halotanowo-pozytywne recesywne homozygoty $Hal^n \times Hal^n$ wykazujące w narkozie halotanowej objawy hipertermii złośliwej. U takich osobników z chwilą osiągnięcia dojrzałości somatycznej, z dużym prawdopodobieństwem wystąpią poubojowe zmiany typu PSE lub DFD. Badania wykazały, że w badanej populacji halotanowo-pozytywne homozygoty stanowiły 0,86% i tym samym potwierdziły istnienie w stadzie rodzicielskim halotanowo-pozytywnych homozygot i/lub halotanowo-negatywnych heterozygot. Uzyskane wyniki opublikowano w podanym niżej opracowaniu:

- **Paszkiewicz W.:** Podatność na miopatie (syndromy PSE i DFD) u świń stwierdzana testem halotanowym. *Medycyna Wet.* 1992, 48, 159-160

Problem zwiększonej stresowrażliwości dotyczy całej krajowej populacji świń. O tym, że nie można go zawęzić jedynie do hodowli wielkotowarowej świadczy rozpoznany i udokumentowany kliniczny przypadek martwicy mięśni grzbietu (MMG) u świni utrzymywanej w chowie ekstensywnym. Szczegółowy opis przypadku opublikowano w podanym niżej opracowaniu:

- **Paszkiewicz W., Sudol J., Łopuszyński W.:** Przypadek martwicy mięśni grzbietu (MMG) u świni. *Medycyna Wet.* 1994, 50, 453-455

ad 2.

Działalność przemysłowa jest głównym czynnikiem niekorzystnie wpływającym na środowisko naturalne, a zanieczyszczenia przemysłowe oddziałują negatywnie na wszystkie jego elementy. W ocenie zanieczyszczenia środowiska szczególną rolę

odgrywają m.in. gospodarka odpadami i wodno-ściekowa. Zakłady pozyskujące i przetwarzające mięso zaseregowane są do inwestycji mogących potencjalnie znacząco oddziaływać na środowisko. Z jednej strony dokonuje się to poprzez wytwarzanie odpadów niebezpiecznych dla środowiska, do których należą wszystkie odpady zakładów tej branży, z drugiej zaś przez wprowadzanie doń ścieków. Ścieki z zakładów mięsnych są uciążliwe dla środowiska, co wynika z zawartości w nich dużej ilości zanieczyszczeń organicznych (odchody, treść przewodu pokarmowego, skrawki mięśniowe, popłuczyny z procesów technologicznych), chemicznych (NaCl, azotyny, azotany i fosforany, środki dezynfekcyjne), mikrobiologicznych i parazytologicznych oraz emisji tzw. odorów, czyli niekorzystnych substancji zapachowych. Próba rozpoznania rodzaju i stopnia zanieczyszczenia odpływów z 2 różnych pod względem nowoczesności zakładów mięsnych legła u podstaw podjęcia przeze mnie w 1995 r. badań w tym obszarze. Badania te ukierunkowały również temat mojej rozprawy doktorskiej, której głównym zagadnieniem badawczym stało się określenie wpływu dodatku ekstraktu z *Yucca schidigera* (*Yucca schidigera* ekstrakt – YSE) na parametry fizykochemiczne, mikrobiologiczne i sensoryczne ścieków. Preparaty zawierające YSE wykazywały bowiem dowiedzioną skuteczność w ograniczaniu emisji odorów (zwłaszcza NH₃) w budynkach inwentarskich, zarówno gdy były używane jako dodatek paszowy w żywieniu zwierząt, jak i przy bezpośrednim stosowaniu do ściółki czy zbiorników z gnojowicą. Otrzymany w badaniach własnych niższy o ok. 10% poziom amoniaku w ściekach z dodatkiem YSE potwierdził jego skuteczność w ograniczaniu emisji związków odorotwórczych. Redukcja poziomu NH₃ mimo, że nie była jednak tak duża, jak w przypadku użycia YSE do zbiorników z gnojowicą lub do ściółki (37-93%), okazała się wystarczająca dla istotnego obniżenia intensywności negatywnego zapachu ścieków. Wpływ YSE na pozostałe parametry ścieków oraz charakterystykę rodzajów i ładunków zanieczyszczeń odpływów z rzeźni przedstawiłem szczegółowo w rozprawie doktorskiej pt. „Obciążenie odpływów z rzeźni substancjami biologicznymi i chemicznymi oraz próba ich ograniczenia”, którą zrealizowałem pod kierunkiem prof. dr hab. Elżbiety Pełczyńskiej w latach 1996-1999. Część wyników uzyskanych w ramach badania ścieków została przedstawiona również w formie doniesień konferencyjnych - zał. Nr 4 pkt B poz. 2, 4 i 6.

Jednym z zagrożeń związanych z badanymi ściekami z zakładów mięsnych było powszechne (51% wszystkich przebadanych próbek) występowanie w nich pałeczek z rodzaju *Salmonella*. Wyizolowałem 11 serotypów salmonelli, spośród których

najczęściej występowały *S. Derby* i *S. Agona*. W badanych odpływach wykryłem również *S. Mbandaka*, serotyp wyizolowany po raz pierwszy w Polsce w 1995 r. Szczegółowe rezultaty analiz opublikowano w następującym opracowaniu:

- **Paszkiwicz W.:** Pałeczki *Salmonella* w ściekach z zakładów przemysłu mięsnego. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 147-149

oraz w formie doniesienia konferencyjnego - zał. Nr 4, pkt B poz. 3.

Odpływy z obu zakładów zawierały też formy rozwojowe pasożytów. Stwierdzono je w jednakowym odsetku próbek (73,3%) z obu zakładów. Najczęściej izolowano jaja nicieni podrzędu *Strongylata*, następnie jaja *Ascaris sp.* oraz larwy nicieni. Szczegóły jakościowego i ilościowego zanieczyszczenia ścieków formami rozwojowymi pasożytów zostały przedstawione w następującej publikacji:

- **Paszkiwicz W.:** Występowanie pasożytów w ściekach z zakładów mięsnych. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 114-116

oraz w formie doniesienia konferencyjnego: zał. Nr 4, pkt B poz. 5.

Zgromadzenie wielu danych na temat stanu środowiska naturalnego w związku z realizacją opisanych wyżej badań skłoniło mnie do dokonania oceny stanu środowiska w Polsce, którą zawarłem w wymienionej niżej publikacji:

- **Paszkiwicz W.:** Zanieczyszczenie środowiska naturalnego w Polsce – na podstawie danych statystycznych. *Rocz. Inst. Przem. Mięsn. i Tłuszcz.* XXXVII, 2000, 207-216

ad 3.

Osobną dziedziną moich zainteresowań jest prawodawstwo weterynaryjne, ze szczególnym uwzględnieniem prawa żywnościowego. Zainteresowanie to było przyczynkiem do powstania 8 wymienionych poniżej publikacji w latach 1999-2004, a więc w okresie największych i szybko przebiegających zmian legislacyjnych w związku z akcesją Polski do UE. Należy podkreślić, że w wymienionym okresie nie były jeszcze powszechnie dostępne bazy danych dokumentujące akty prawa unijnego i krajowego w formie elektronicznej.

- **Paszkiwicz W.:** Przepisy prawne dotyczące weterynarii wydane w 1999 r. (uzupełnienie). *Medycyna Wet.* 2000, 56, 199-201

- **Paszkiwicz W.:** Wykaz przepisów prawnych z zakresu weterynarii wydanych w 2000 r. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 66-67

- **Paszkiwicz W.:** Wykaz przepisów prawnych z zakresu weterynarii wydanych w 2000 r. (uzupełnienie). *Medycyna Wet.* 2001, 57, 292-293

- **Paszkiwicz W.:** Przepisy prawne dotyczące weterynarii wydane w 2001 r. cz. I. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 383-387

- **Paszkiwicz W.:** Przepisy prawne dotyczące weterynarii wydane w 2001 r. cz. II. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 474-478

- **Paszkiwicz W.:** Przepisy prawne dotyczące weterynarii wydane w 2002 r. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 359-364

- **Paszkiwicz W.:** Przepisy prawne dotyczące weterynarii wydane w 2003 r. Medycyna Wet. 2004, 60, 441-445
- **Paszkiwicz W.:** Przepisy prawne dotyczące weterynarii wydane w 2004 r. Medycyna Wet. 2005, 61, 471-476.

Efektom tych zainteresowań było również współautorstwo monografii poświęconej prawnym unormowaniom i normalizacji w zakresie obrotu, uboju oraz badania sanitarno-weterynaryjnego zwierząt rzeźnych i mięsa - zał. Nr 3, pkt II D poz. 16.

Kontynuacja tych zainteresowań zaowocowała współautorstwem wymienionej poniżej publikacji:

- Ziomek M., Szkucik K., Maćkowiak-Dryka M., **Paszkiwicz W.**, Drozd Ł., Pysz-Lukasik R.: Wymagania weterynaryjne przy pozyskiwaniu i przetwarzaniu ślimaków jadalnych. Med. Weter. 2017, 73, 819-825

oraz rozdziału w monografii (zał. nr 3 pkt II D poz. 17) i 3 doniesień konferencyjnych - zał. Nr 4 pkt B poz. 7-9.

ad 4.

Dokonana w Polsce w latach dziewięćdziesiątych XX w. zmiana kryteriów oceny mleka surowego oraz perspektywa przystąpienia i dokonana akcesja Polski do Unii Europejskiej wymusiły istotne zmiany w jakości higienicznej polskiego mleka. Fundusze krajowe i wspólnotowe ułatwiły modernizację zakładów mleczarskich i dostosowanie ich do wymagań unijnych. Spowodowało to znaczny wzrost obrotu produktami mlecznymi do krajów UE, co z kolei zwiększyło skup mleka surowego przez polskie mleczarnie. Część mleczarni zlikwidowano z przyczyn ekonomicznych lub sanitarnych, a części przyznano (do 31.12.2006 r.) tzw. dostosowawczy okres przejściowy, ze względu na niewypełnianie standardów unijnych, głównie w odniesieniu do jakości higienicznej mleka surowego. Celem podjętych w 2005 r. badań była ocena jakości higienicznej mleka surowego skupowanego przez 2 zakłady mleczarskie od producentów znajdujących się w okresie dostosowawczym, z 2 różnych rejonów wschodniej części kraju. Uzyskane wyniki wykazały, że mleko surowe z obu mleczarni nie spełniało standardów przejściowych i norm higienicznych w zakresie poziomu zanieczyszczenia bakteryjnego i liczby komórek somatycznych, a w jednym z zakładów również wymogów w zakresie kwasowości i braku substancji hamujących. Wyniki tych badań były punktem odniesienia do oceny rzeczywistego stopnia zaawansowania przetwórców w mleczarstwie w tym regionie. Okres przejściowy, w którym wykonano badania był szansą dla producentów na poprawę jakości higienicznej mleka. Dla wykorzystania tej szansy potrzebna była jednak zarówno świadomość producentów, jak i system rygorystycznych kontroli stanu zdrowia krów i jakości mleka. Szansę tę wykorzystał

tylko jeden z badanych zakładów, który w 2007 r. otrzymał zatwierdzenie do produkcji na rynek Wspólnoty Europejskiej i z takim statusem funkcjonuje do dnia dzisiejszego. Szczegółowe wyniki badań opublikowano w następującym opracowaniu:

- Pełczyńska E., **Paszkiwicz W.**: Jakość higieniczna mleka surowego z terenu wschodniej Polski w tzw. okresie przejściowym. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 1572-1575

Mleko spożywcze ze względu na preferencje konsumentów, jest jednym z ważniejszych produktów polskich przedsiębiorstw mleczarskich. Celem przeprowadzonych przeze mnie w latach 2007-2008 badań było rozpoznanie jakości dostępnego w handlu detalicznym pasteryzowanego mleka spożywczego. Łącznie przebadano 100 próbek mleka z 7 zatwierdzonych do produkcji na rynek mleczarni, z różnych regionów Polski. Otrzymane wyniki wskazały na niedostateczną ze strony części zakładów mleczarskich kontrolę jakości produkowanego mleka (rozwodnienie, obniżona zawartość tłuszczu i suchej masy, obecność substancji hamujących), a ze strony jednostek nadzorujących obrót detaliczny - na niewłaściwą kontrolę przechowywania mleka w miejscach jego sprzedaży (przerwanie ciągłości łańcucha chłodniczego skutkujące nadkwaszeniem mleka). Szczegółowe wyniki badań ujęto w wymienionej publikacji:

- **Paszkiwicz W.**: Jakość mleka pasteryzowanego znajdującego się w handlu. *Medycyna Wet.* 2009, 65, 131-133

oraz w formie doniesienia konferencyjnego - zał. Nr 4 pkt B poz. 11.

Jedną z konsekwencji akcesji Polski do UE było prawne usankcjonowanie możliwości prowadzenia tzw. sprzedaży bezpośredniej. W formule tej producent pozyskujący surowce w ramach produkcji pierwotnej ma prawo je sprzedawać konsumentowi finalnemu. Do sprzedaży bezpośredniej dopuszczono również sprzedaż mleka surowego, a jedną z form jego dystrybucji są automaty (mlekomaty). Badania, których byłem współautorem przeprowadzone w latach 2013-2014 służyły określeniu jakości mikrobiologicznej mleka surowego dostarczanego konsumentowi w formule sprzedaży bezpośredniej z mlekomatów. Uzyskane wyniki wykazały nieprawidłową jakość mikrobiologiczną mleka we wszystkich badanych mlekomatach (przekroczone limity zanieczyszczenia mikrobiologicznego oraz dodatkowo obecność patogenów w niektórych próbkach) i wskazały na nieprawidłowe warunki higieniczne na etapie doju, jako przyczynę tego stanu rzeczy. Szczegółowe wyniki analiz opublikowano w następującym opracowaniu:

- Pysz-Lukasik R., **Paszkiwicz W.**, Tatar M.R., Brodzki P., Bełkot Z.: Microbiological quality of milk sold directly from producers to consumers. J. Dairy Sci. 2015, 98, 4294-4301

Wyniki innych badań dotyczących mleka i produktów mlecznych, w których uczestniczyłem przedstawiono w formie doniesień konferencyjnych - zał. Nr 4 pkt. B poz. 10, 12, 23-25 i 27.

ad 5.

Bezpieczeństwo i trwałość pozyskiwanego w rzeźniach mięsa zależy przede wszystkim od warunków sanitarnych, w jakich przeprowadzane są procesy uboju i obróbki poubojowej zwierząt rzeźnych. Do największego mikrobiologicznego zanieczyszczenia mięsa dochodzi bowiem podczas czynności poubojowych. Z tego powodu wyznaczone prawem kryteria higieny mają na celu określenie jakości mikrobiologicznej procesu uboju i obróbki poubojowej zwierząt rzeźnych. Oparte są one o poziom zanieczyszczenia tusz bakteriami tlenowymi i z rodziny *Enterobacteriaceae* (z wyjątkiem drobiu) oraz brak obecności (lub limitowaną obecność) *Salmonella spp.* i różnicują jakość procesu, odpowiednio, na 3 i 2 poziomach. Celem rozpoczętego w 2007 r. i współrealizowanego przeze mnie cyklu badań, było określenie zanieczyszczenia mikrobiologicznego wymienionymi bakteriami powierzchni tusz wieprzowych, wołowych, cielęcych, baranich i jagnięcych, w zależności od kolejności i liczby ubijanych zwierząt w trakcie dnia ubojowego. Badania przeprowadzono w polskich ubojniach posiadających uprawnienia do produkcji na rynek. Uzyskane wyniki wykazały, że kolejność i liczba ubijanych zwierząt nie wpływały na poziom zanieczyszczenia mikrobiologicznego tusz i potwierdziły zadowalającą jakość higieny procesu uboju we wszystkich badanych zakładach. Tym samym wskazały na skuteczność działających w zakładach systemów HACCP oraz prawidłowy sposób sprawowania nadzoru sanitarno-weterynaryjnego. Szczegółowe wyniki badań opublikowano w następujących pracach:

- Pysz-Lukasik R., **Paszkiwicz W.**: Zanieczyszczenie bakteryjne powierzchni tusz w zależności od kolejności ubijanych świń. Medycyna Wet. 2007, 63, 1611-1512
- **Paszkiwicz W.**, Pysz-Lukasik R.: Zanieczyszczenie bakteryjne powierzchni tusz wołowych w zależności od kolejności ubijanego bydła. Medycyna Wet. 2010, 66, 51-53
- **Paszkiwicz W.**, Pysz-Lukasik R.: Bacterial contamination of calf carcasses during production cycle. Bull. Vet. Inst. Pulawy 2012, 56, 47-49
- Pysz-Lukasik R., **Paszkiwicz W.**: Zmienność zanieczyszczenia bakteryjnego tusz jagnięcych w czasie uboju. Med. Weter. 2013, 69, 552-554
- Pysz-Lukasik R., **Paszkiwicz W.**: Hygiene assessment of sheep slaughter cycle. Bull. Vet. Inst. Pulawy 2014, 58, 243-246; doi: 10.2478/bvip-2014-0036

oraz w doniesieniach konferencyjnych - zał. Nr 4, pkt. B poz. 13-15 i 17.

ad 6.

Stwierdzone na etapie badania sanitarno-weterynaryjnego zwierząt poubojowe zmiany chorobowe i odchylenia jakościowe są najważniejszą przyczyną dyskwalifikacji sanitarnej tusz i narządów. Współautorstwo prowadzonych w tym zakresie badań oraz analiz dokumentujących przyczyny konfiskat mięsa i innych jadalnych tkanek zwierząt były przyczynkiem do powstania cyklu wymienionych niżej publikacji:

- Sadzikowski A.B., Szkucik K., Szczepaniak K.O., **Paszkiwicz W.**: Występowanie pierwotniaków rodzaju Eimeria u królików rzeźnych pochodzących z różnych hodowli. Medycyna Wet. 2008, 64, 1426-1429
- Szkucik K., **Paszkiwicz W.** - Występowanie zmian chorobowych i odchyłeń jakościowych w tuszkach królików rzeźnych w Polsce w latach 2000 – 2010. Medycyna Wet. 2011, 67, 690-693
- Szkucik K., Ziomek M., **Paszkiwicz W.**: Występowanie zmian chorobowych i odchyłeń jakościowych u drobiu rzeźnego w latach 2000-2010. Życie Wet. 2011, 86, 988-992
- Szkucik K., Pysz-Lukasik R., **Paszkiwicz W.**: Występowanie zmian chorobowych i odchyłeń jakościowych w tuszkach koni rzeźnych w Polsce w latach 2001-2010. Med. Weter. 2012, 68, 418-421
- Szkucik K., Pysz-Lukasik R., Szczepaniak K. O., **Paszkiwicz W.**: Occurrence of gastrointestinal parasites in slaughter rabbits. Parasitol. Res., 2014, 113, 59-64; doi:10.1007/s00436-013-3625-7
- Szkucik K., Pysz-Lukasik R., **Paszkiwicz W.**: Występowanie zmian chorobowych i odchyłeń jakościowych w tuszkach owiec i kóz rzeźnych w Polsce w latach 2003-2013. Med. Weter. 2014, 70, 626-629
- Pysz-Lukasik R., Szkucik K., **Paszkiwicz W.**, Drozd Ł. - Results of sanitary-veterinary examination of fish in Poland in 2010-2016. Med. Weter. 2018, 74, 301-303.

oraz doniesień konferencyjnych - zał. nr 4 pkt. B poz. 19 i 29.

ad 7.

Nowym tematem badawczym, w którego realizacji uczestniczyłem była jakość zdrowotna hodowlanych ryb słodkowodnych. Badaniami objęto 4 gatunki ryb z polskich gospodarstw rybackich: amura białego, tołpygę pstrą, jesiotra syberyjskiego i suma. W tkankach mięśniowych wymienionych gatunków ryb oznaczono skład podstawowy i profil aminokwasowy (a u tołpygi i suma również zawartość wolnych aminokwasów), określono wartość energetyczną, oceniono jakość białka (wskaźniki CS, PDCAAS i EAAI) oraz jakość mikrobiologiczną. Uzyskane wyniki wskazały na wysoką wartość odżywczą i dobrą jakość mikrobiologiczną tkanki mięśniowej wszystkich badanych gatunków ryb. Szczegółowe rezultaty analiz opublikowano w wymienionych poniżej pracach:

- Pysz-Lukasik R., Szpetnar M., **Paszkiwicz W.**, Tatar M. R., Brodzki A. R.: Free amino acid content in muscle tissue of bighead carp and wels catfish. Med. Weter. 2016, 72, 632-636.

- Pyz-Łukasik R., **Paszkiwicz W.**: Species variations in the proximate composition, amino acid profile, and protein quality of the muscle tissue of grass carp, bighead carp, Siberian sturgeon, and wels catfish. J Food Quality 2018, Article ID 2625401, 8 pages; <https://doi.org/10.1155/2018/2625401>

- Pyz-Łukasik R., **Paszkiwicz W.**: Microbiological quality of farmed grass carp, bighead carp, Siberian sturgeon, and wels catfish from Eastern Poland. J Vet Res 2018, 62, 145-149; doi:10.2478/jvetres-2018-0023

oraz w doniesieniu konferencyjnym - zał. nr 4 pkt. B poz. 28.

ad 8.

W ramach mojej aktywności naukowej uczestniczyłem ponadto w realizacji kilku tematów badawczych i analizach dotyczących: a) jakości mięsa brojlerów, b) skuteczności promieniowania UV w dezynfekcji powietrza, c) składu chemicznego mięsa i jajeczek ślimaków jadalnych oraz d) parabenów. Wyniki tych aktywności opublikowano w wymienionych poniżej opracowaniach:

- Szkucik K., Pisarski R.K., **Paszkiwicz W.**, Pijarska I.: Jakość tuszek, skład chemiczny i cechy sensoryczne mięsa kurcząt brojlerów żywionych mieszanką o zmniejszonej zawartości energetycznej. Medycyna Wet. 2009, 65, 184-187

- **Paszkiwicz W.**, Pyz-Łukasik R.: Stopień redukcji zanieczyszczenia bakteryjnego powietrza pod wpływem promieni UV. Medycyna Wet. 2011, 67, 267-269

- Pyz-Łukasik R., **Paszkiwicz W.**, Latoch A.: Skuteczność promieniowania UV w dezynfekcji powietrza w kabinie do badań mikrobiologicznych. Med. Weter. 2016, 72, 709-711

- Szkucik K., Ziomek M., Maćkowiak-Dryka M., **Paszkiwicz W.**: Ślimaki jadalne – użytkowość, wartość odżywcza i bezpieczeństwo dla zdrowia konsumenta. Życie Wet. 2011, 86, 631-635

- Drozd Ł., Ziomek M., Szkucik K., **Paszkiwicz W.**, Maćkowiak-Dryka M., Bełkot Z., Gondek M.: Selenium, copper, and zinc concentrations in the raw and processed meat of edible land snails harvested in Poland. J. Vet. Res. 2017, 61, 293-298; doi: 10.1515/jvetres-2017-0039

- Ziomek M., Drozd Ł., Chałabis-Mazurek A., Szkucik K., **Paszkiwicz W.**, Valverde Piedra J. L., Bełkot Z. Maćkowiak-Dryka M., Gondek M., Knysz P.: Concentration levels of cadmium and lead in the raw and processed meat of *Helix pomatia* snails. Pol. J. Vet. Sci., 2018, 21(3); doi:10.5601/jelem.2018.23.2.1195; praca przyjęta do druku

- Maćkowiak-Dryka M., **Paszkiwicz W.**, Drozd Ł.: Parabeny - substancje konserwujące stosowane w żywności a bezpieczeństwo zdrowia konsumenta. Med. Weter. 2015, 71, 553-556

oraz doniesieniach konferencyjnych: zał. nr 4 pkt B poz. 18, 20-22 i 30.

B. Działalność dydaktyczna

Od początku pracy w Katedrze Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia uczestniczę w pełnym wymiarze godzin, w realizacji procesu dydaktycznego prowadząc ze studentami IV i V roku Wydziału Medycyny Weterynaryjnej ćwiczenia z przedmiotów: „Higiena zwierząt rzeźnych i mięsa”, „Higiena produktów pochodzenia zwierzęcego”, a od 1995 r. również „Higiena mleka”. Od 2011 r. jestem osobą

odpowiedzialną za przedmiot „Higiena mleka” realizowany w 8 semestrze na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej, a od 2014 r. za przedmioty „Mikrobiologia żywności” i „Bezpieczeństwo żywienia zbiorowego” (fakultet) realizowane odpowiednio w 4 i 6 semestrze na kierunku Bezpieczeństwo i certyfikacja żywności prowadzonym na Wydziale Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki UP w Lublinie. Prowadzę również zajęcia ze studentami III roku Wydziału Agrobiotechnologii kierunku Towaroznawstwo UP w Lublinie z przedmiotu „Higiena surowców i produktów spożywczych”. Ponadto w latach 2010-2012 r. byłem osobą odpowiedzialną za nowy przedmiot „Ochrona zdrowia publicznego w stanach zagrożeń” realizowany w 5 semestrze na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej, dla którego opracowałem program nauczania. Jestem również autorem takich programów dla wymienionych wcześniej przedmiotów: „Mikrobiologia żywności” i „Bezpieczeństwo żywienia zbiorowego”.

W latach 2003-2005 w ramach studiów podyplomowych organizowanych przez Centrum Kształcenia Ustawicznego AR w Lublinie prowadziłem wykłady nt. nadzoru sanitarnego nad żywnością i systemu HACCP, a od 2012 r. prowadzę ćwiczenia z przedmiotu „Analityka mikrobiologiczna żywności” w ramach studiów podyplomowych Analityka, Bezpieczeństwo i Certyfikacja Żywności organizowanych przez Centrum Kształcenia Ustawicznego UP w Lublinie.

W latach 2006-2016 pełniłem funkcję wydziałowego pełnomocnika do spraw praktyk studentów IV i V roku Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w zakresie praktyk w Inspekcji Weterynaryjnej (obowiązkowe w ramach programu nauczania przedmiotów „Higiena zwierząt rzeźnych i mięsa” i „Higiena produktów pochodzenia zwierzęcego”).

Jestem współautorem podręcznika akademickiego poświęconego przepisom prawnym i normalizacji na etapie obrotu, uboju oraz badania sanitarno-weterynaryjnego zwierząt rzeźnych i mięsa - zał. nr 3 pkt II D poz. 16.

Jestem również współautorem 2 filmów dydaktycznych poświęconych technologii uboju i badaniu sanitarno-weterynaryjnemu królików oraz koni. Dokonałem także tłumaczenia na język polski komentarzy do 3 filmów instruktażowych Komisji Europejskiej (wydanych przez Urząd Oficjalnych Publikacji Wspólnot Europejskich - Office for Official Publications of the European Communities), a dotyczących wymagań higienicznych przy uboju i obróbce poubojowej świń, bydła oraz owiec. Wszystkie wymienione filmy wykorzystywane są w realizacji programu nauczania przedmiotu „Higiena zwierząt rzeźnych i mięsa”.

Ponadto w ramach działalności związanej z nauczaniem:

- 1) w 2005 r. przeprowadziłem cykl szkoleń dla rolników – producentów mleka z terenu woj. lubelskiego pt. „Dobrostan zwierząt” realizowanych przez Fundację Rozwoju Lubelszczyzny w oparciu o projekt Fundacji Pomocy Programów dla Rolnictwa (FAPA) współfinansowany ze środków UE w ramach Sektorowego Programu Operacyjnego Restrukturyzacja i Modernizacja Sektora Żywnościowego oraz Rozwój Obszarów Wiejskich 2004-2006 w zakresie działania „Szkolenia”
- 2) w 2007 r. przeprowadziłem dwa szkolenia dla myśliwych nt. bezpieczeństwa żywności oraz wymagań jakie powinny być spełnione przy wprowadzaniu na rynek mięsa zwierząt łownych
- 3) od 2013 r. prowadzę wykłady w ramach specjalizacyjnych studiów podyplomowych lekarzy weterynarii (Specjalizacja Nr 15 - Higiena zwierząt rzeźnych i żywności zwierzęcego pochodzenia) realizowanych na Wydziałach Medycyny Weterynaryjnej w Olsztynie, Warszawie i Wrocławiu, a od 2016 r. również w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym - Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach.

Byłem recenzentem dwóch prac licencjackich studentów Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie - zał. 4 pkt J poz. 1.

Trzykrotnie uczestniczyłem w projektach prezentowanych w ramach Lubelskiego Festiwalu Nauki oraz jestem współautorem dwóch publikacji popularnonaukowych - zał. 4 pkt I poz. 2-6.

C. Inna działalność

Nawiązana w trakcie dotychczasowej działalności naukowej współpraca z Centrum Badań Weterynaryjnych Vetcomplex Sp. z o. o. w Łodzi, Zakładem Wirusologii Żywności i Środowiska PIWet.-PIB w Puławach oraz Zakładem Technologii Mięsa i Zarządzania Jakością Katedry Technologii Surowców Pochodzenia Zwierzęcego Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii UP w Lublinie pozwoliła rozszerzyć zakres wykorzystywanych metod badawczych w realizowanych i planowanych projektach m.in. o metody badań genetycznych i instrumentalne metody pomiaru cech sensorycznych żywności. Efekty tej współpracy już znalazły odzwierciedlenie w kilku opublikowanych pracach - zał. Nr 3 pkt. I B poz. 2-4 oraz pkt II A poz. 17.

Od 2011 r. do chwili obecnej wykonuję urzędowe czynności zlecone przez Powiatowego Lekarza Weterynarii w Lublinie w zakresie badania mięsa zwierząt

rzeźnych i łownych przeznaczanego na potrzeby własne. Badanie to przeprowadzane jest w powołanej przy Katedrze Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP terenowej stacji badania na włośnie (Nr 0663011). Doświadczenie i materiał uzyskiwane w ramach tej działalności z powodzeniem wykorzystuję zarówno w pracy dydaktycznej, jak i naukowej.

Działalność organizacyjna na Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie:

- członek Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w latach 2005-2012
- członek Komisji Oceniającej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w kadencji 2008-2012
- członek Zespołu Wdrażającego System Zarządzania Jakością ISO 9001 na UP w Lublinie w latach 2010-2011

Pełny wykaz opublikowanych przeze mnie prac naukowych znajduje się w załączniku nr 3 do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego.

Szczegółowe informacje o dorobku dydaktycznym i popularyzatorskim, współpracy naukowej oraz innej działalności (wg Dz. U. z 2011 r. Nr 196, poz. 1165) przedstawiłem w załączniku nr 4 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

Waldemar Paszkiewicz

Lublin, 24.08.2018 r.