

Prof. dr hab. Magdalena Gajęcka
Uniwersytet Warmińsko – Mazurski
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz
ul. Oczapowskiego 13
10-718 Olsztyn

Olsztyn, dnia 23 maja 2023 roku.

RECENZJA

osiągnięcia naukowego będącego podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego oraz całokształtu dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego dr Tomasza Grendy, adiunkta w Zakładzie Higieny Pasz, PIWet-PIB w Puławach.

Przedstawioną poniżej recenzję opracowałam na podstawie następujących dokumentów:

1. uwierzytelnionej kopii dokumentu potwierdzającego posiadanie stopnia doktora nauk weterynaryjnych;
2. autoreferatu w języku polskim;
3. oświadczeniu współautorów prac stanowiących jednotematyczny cykl publikacji;
4. kopie publikacji (7) stanowiący jednoznaczny zbiór publikacji;
5. własnej wiedzy na temat badań prowadzonych przez Dysertanta.

Według mojej oceny, otrzymane materiały, są zgodne z wymaganiami na podstawie art. 221 ust. 10 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 ze zm.).

Podstawa wykonania

Przyczynkiem do wykonania niniejszej recenzji, jest uchwała Nr 6/2023 Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, z dnia 08 marca 2023 r., o powołaniu mnie na recenzenta w postępowaniu habilitacyjnym dr. Tomasza Grendy, w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie weterynaria.

Podstawowe informacje o Kandydacie

Pan dr Tomasz Grenda urodził się 1 stycznia 1982 r. w Lublinie. Ukończył studia podyplomowe: „Zarządzanie jakością w produkcji żywności”, na Akademii Rolniczej w Lublinie (obecnie: Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie) w 2007 r. W tym samym roku 2007, dr. Tomasz Grenda na Wydziale Nauk o Żywności i Biotechnologii, Akademii Rolniczej w Lublinie (obecnie: Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie) obronił pracę magisterską (mgr inż. technologii żywności i żywienia człowieka, specjalność: biochemia i biotechnologia żywności) pt. „Porównanie dwóch metod śrutowania słoju browarniczego w czasie produkcji brzoźki piwnej”. W 2011 roku dr Tomasz Grenda uzyskał stopień doktora - nauk weterynaryjnych na podstawie przedłożonej dysertacji pod tytułem - „Wykrywanie *Clostridium botulinum* w paszach i żywności metodami biologii molekularnej”. W latach 2011 – 2012 dr Tomasz Grenda był zatrudniony na stanowisku specjalisty inżynierjno - technicznego w Zakładzie Higieny Pasz w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym - Państwowym Instytucie Badawczym (PIWet-PIB) w Puławach. Po uzyskaniu stopnia doktora, Habilitant w latach 2012 – 2014 został zatrudniony w Zakładzie Higieny Pasz, PIWet-PIB w Puławach na stanowisku głównego specjalisty badawczo – technicznego. W 2014 roku, również w Zakładzie Higieny Pasz, PIWet-PIB w Puławach przeszedł na stanowisko adiunkta, gdzie pracuje do chwili obecnej. Po dwóch latach (04.04.2016 – 03.10.2016 r.), od momentu zatrudnienia na stanowisku adiunkta dr Tomasz Grenda odbył najpierw sześciomiesięczny zagraniczny staż podoktorski – w Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UA, Wielka Brytania, a następnie w 2019 roku (07.05.2019 – 07.08.2019), trzymiesięczny zagraniczny staż podoktorski w Soil and Water Research Infrastructure, Biology Centre CAS Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice, Czechy.

Ocena osiągnięcia naukowego

Problematyka badawcza, która została podjęta przez dr Tomasza Grendę dotyczy przede wszystkim badań, między innymi nad oceną występowania *Clostridium* spp. zwłaszcza *C. botulinum* i *C. perfringens* w próbkach żywności pochodzących od polskich producentów oraz obecności tych patogenów w miodach pochodzących z polskich i kazachskich pasiek. Podobne badania naukowe wykonano badając stopień zanieczyszczeń przez *Clostridium* spp., w szczególności *C. botulinum* i inne potencjalne patogenne szczepy tego rodzaju w paszach z dodatkiem nowych materiałów paszowych typu IPAP (Insect Processed Animal Proteins – przetworzone białko zwierzęce pochodzenia owadziego). Prace objęły również

W skład osiągnięcia wchodzi następujące publikacje:

- H1. Grenda T.***, Grabczak M., Kwiatek K., Bober, A. *Prevalence of C. botulinum and C. perfringens spores in food products available on Polish market*. J Vet Res 2017, 61(3) 287-291. <https://doi.org/10.1515/jvetres-2017-0038>. **Praca oryginalna**
* - autor korespondencyjny
IF=0,811; punkty MEiN (wcześniej MNiSW)= 20; liczba cytowań bez autocytowań (Web of Science) – 8
- H2. Grenda T.***, Grabczak M., Sieradzki Z., Kwiatek K., Pohorecka K., Skubida M., Bober A.: *Clostridium botulinum spores in Polish honey samples*. J Vet Sci 2018, 19(5), 635-642. <https://doi.org/10.4142/jvs.2018.19.5.635>. **Praca oryginalna**
* - autor korespondencyjny
IF=1,503; punkty MEiN=30; liczba cytowań bez autocytowań (Web of Science) – 7
- H3. Grenda T.***, Grabczak M., Goldsztejn M., Kozieł N., Kwiatek K., Pohorecka K., Skubida M., Bober A. *Clostridium perfringens spores in Polish honey samples*. J Vet Res 2018, 62(3), 281–284. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2018-0040>. **Praca oryginalna**
* - autor korespondencyjny
IF= 0,829; punkty MEiN= 20; liczba cytowań bez autocytowań (Web of Science) – 3
- H4. Maikanov B.**, Mustafina R., Auteleyeva L., Wiśniewski J., Anusz K., **Grenda T.***, Kwiatek K., Goldsztejn M., Grabczak M. *Clostridium botulinum and Clostridium perfringens Occurrence in Kazakh Honey Samples*. Toxins. 2019; 11(8):472 (s.1-14). <https://doi.org/10.3390/toxins11080472>. **Praca oryginalna**
* - autor korespondencyjny
IF=3,531; punkty MEiN=100; liczba cytowań bez autocytowań (Web of Science) – 12
- H5. Grenda T.***, Kwiatek K., Goldsztejn M., Sapała M, Kozieł N, Domaradzki P. *Clostridia in Insect Processed Animal Proteins—Is an Epidemiological Problem Possible?* Agriculture. 2021; 11(3):270 (s.1-21). <https://doi.org/10.3390/agriculture11030270>. **Praca oryginalna**
* - autor korespondencyjny
IF=3,408; punkty MEiN=100; liczba cytowań bez autocytowań – 2
- H6. Grenda T.***, Kwiatek K., Goldsztejn M. *Botulizm bydła – niedoceniony problem epidemiologiczny*. Med. Weter. 2020, 76 (11), 615-620. DOI: [dx.doi.org/10.21521/mw.6456](https://doi.org/10.21521/mw.6456). **Praca przeglądowa**
* - autor korespondencyjny
IF=0,383; MEiN=70 pkt; liczba cytowań bez autocytowań (Web of Science) – 0
- H7. Grenda T.***, Goldsztejn, M., Kwiatek, K., Kozak, B., Grenda, A. *Animal botulism in Poland – laboratory and epidemiological investigations*. J Vet Res 2022, 66, 189-197, 2022, DOI: [10.2478/jvetres-2022-0026](https://doi.org/10.2478/jvetres-2022-0026). **Praca oryginalna**
* - autor korespondencyjny
IF= 2.058; punkty MEiN=140; liczba cytowań bez autocytowań (Web of Science) – 0
- Sumaryczny IF tych 7 publikacji wynosi **12,523**, a łączna liczba punktów wg Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MEiN) wynosi **480**. Prace są zespołowe, w których Dysertant jest pierwszym autorem, współautorem, ale zawsze autorem korespondencyjnym. Pozostali

współautorzy złożyli oświadczenia, w którym potwierdzają, że udział dr Tomasza Grendy był istotny i pierwszoplanowy podczas kolejnych cykli wydawniczych artykułu.

Dorobek naukowy dr Tomasza Grendy, który został przedstawiony w siedmiu wyżej wymienionych pracach jest istotny, jednolity i ukierunkowany przede wszystkim na występowanie oraz znaczenie epidemiologiczne bakterii z rodzaju *Clostridium* w szczególności gatunkom *C. botulinum* oraz *C. perfringens* w łańcuchu żywnościowym.

Określając bardziej szczegółowo cele prowadzonych badań przez Dysertanta, skoncentrował się na następujących zagadnieniach:

- I. ocenie występowania *Clostridium* spp., w szczególności *C. botulinum* i *C. perfringens* w próbkach żywności pochodzącej od polskich producentów (H1);
- II. ocenie występowania *Clostridium* spp., w szczególności *C. botulinum* i *C. perfringens*, w miodach pochodzących z polskich i kazachskich pasiek (H2, H3, H4);
- III. wstępnej ocenie występowania zanieczyszczenia typu *Clostridium* spp., w szczególności *C. botulinum* i inne potencjalnie patogenne szczepy tego rodzaju, pasz z dodatkiem nowych materiałów paszowych (IPAP) (H5);
- IV. ocenie epidemiologicznej występowania botulizmu zwierząt w Polsce oraz trudności analitycznych w wykrywaniu *C. botulinum* (H6 i H7).

Wymagania prawodawstwa Unii Europejskiej, z zakresu bezpieczeństwa żywności i pasz wskazują na konieczność tworzenia globalnego systemu monitorowania i strategii, w celu zapewnienia między innymi bezpieczeństwa mikrobiologicznego środków spożywczych i pasz, gdyż obecność bakterii np. *Clostridium* może być powodem wystąpienia zagrożeń zdrowotnych dla ludzi, zwierząt i dobrostanu oraz by zapobiegać potencjalnym stratom ekonomicznym. Dlatego podjęcie wszelkiego rodzaju prac, nad opracowaniem i wdrożeniem praktyk w celu ograniczenia tego rodzaju zagrożenia mogłoby zapewnić jeszcze wyższy poziom bezpieczeństwa w łańcuchu żywnościowym. Analiza przedstawionych jako cykl prac, a stanowiących osiągnięcie habilitacyjne dr Tomasza Grendy, jednoznacznie wskazuje na ogromny problem występowania patogennych przedstawicieli *Clostridium* spp. w wielu próbkach pobranych na różnych etapach łańcucha żywnościowego. Dzięki możliwości zastosowaniu szerokiego spektrum metod laboratoryjnych takich jak: testu biologicznego –

MBA, technik PCR i real – time PCR oraz sekwencjonowania Sangera dała możliwość charakterystyki mikroflory z rodzaju *Clostridium*, bakterii gram-dodatnich, beztlenowych, wytwarzających spory laseczek z typu *Firmicutes*, tworzących przetrwalniki. Izolowane one były z różnych próbek żywności, między innymi z miodów na terenie całej Polski oraz pasiek zlokalizowanych w różnych regionach Kazachstanu oraz pasz z dodatkiem IPAP, a także próbek potwierdzających występowanie botulizmu u zwierząt – będący powodem istotnych strat ekonomicznych i wpływających negatywnie na bezpieczeństwo w łańcuchu żywnościowym. Zagadnienia epidemiologiczne oraz mechanizmy pojawiania się i działania patogennych przedstawicieli *Clostridium* spp. takich jak *C. perfringens* oraz *C. botulinum* zostały wielopłaszczyznowo opisane w pracach jak również trudności, które pojawiały się przy diagnostyce laboratoryjnej botulizmu była ze względu na chociażby zróżnicowanie genetyczne szczepów *C. botulinum*.

W H1. – w pracy poddano ocenie występowanie *C. botulinum* i *C. perfringens* w próbkach żywności pozyskanych od polskich producentów. Produkty analizowano przy zastosowaniu tradycyjnych metod hodowlanych w połączeniu z testem biologicznym na myszach (MBA – Mouse Bioassay) oraz metodami PCR, real – time PCR, a także analizą sekwencji produktów PCR. Analizy przeprowadzono wobec 260 próbek żywności, tj. wobec 56 próbek mięsa wędzonego, 21 próbek mięsa wieprzowego, 20 próbek różnych produktów mlecznych, 26 próbek przetworów warzywno-owocowych, 40 próbek dań gotowych, 27 próbek przetworów rybnych i 70 próbek-miodów zebranych bezpośrednio z pasiek. Każda z próbek była poddawana hodowli w warunkach beztlenowych z zastosowaniem pożywki bulionowej TPGY i pożywki wg Willis – Hobbs. Dodatkowo, w celu weryfikacji otrzymanych wyników i potwierdzenia toksynotwórczości szczepów podejrzanych o przynależność do gatunku *C. botulinum*, zastosowano test biologiczny na myszach laboratoryjnych (MBA).

Przeprowadzone analizy wykazały obecność *C. botulinum* w 6/260 (2,3%) badanych próbek. W czterech z nich (4/260) wykazano obecność genów *ntnh* i *bont/A* oraz w dwóch *bont/B* (2/260) – już na etapie hodowli płynnej. Test biologiczny na myszach laboratoryjnych potwierdził toksynotwórczość wszystkich uzyskanych izolatów dla których otrzymano pozytywne wyniki PCR. Szczepy *C. perfringens* wyizolowano z 14% (37/260) przebadanych próbek.

Jeżeli chodzi o *C. botulinum* to trudności analityczne w wykrywaniu są związane m.in. z niskim poziomem zanieczyszczenia oraz możliwością rozwoju mikroorganizmów o niższych wymaganiach metabolicznych np. *C. perfringens*.

Spośród badanych produktów spożywczych, zanieczyszczenie sporami *C. botulinum* wykazywał jedynie miód. Miód pozyskiwany był bezpośrednio z pasiek pszczelich. Miód jest produktem o wysokim stężeniu cukrów prostych, dużym ciśnieniu osmotycznym, niesprzyjającym rozwojowi komórek vegetatywnych. Możliwa jest jednak obecność przetrwalników *Clostridium spp.*, pochodzących z pyłków roślinnych lub larw owadów. Uzyskane dane nt. występowania przetrwalników *C. botulinum* w miodzie, zdaje się korelować z wynikami przedstawianymi przez innych autorów.

Dokładna liczba przetrwalników *Clostridium* która może wywołać botulizm lub inne schorzenia związane z oddziaływaniem patogennym przedstawicieli tego rodzaju, nie jest oszacowana. Jednakże, uznaje się, że nawet 1 spora *C. botulinum* może wywołać zatrucie jadem kiełbasianym u niemowląt. Uzyskane dane, sugerują potrzebę przeprowadzenia szczegółowej analizy ryzyka, obejmującej każdy etap pobierania miodu, związaną z prawdopodobieństwem wystąpienia botulizmu niemowląt po jego spożyciu.

Liczba badanych próbek zanieczyszczonych *C. perfringens* była znacznie wyższa niż zanieczyszczonych przez *C. botulinum*. Występowanie *C. perfringens* w miodzie było bardzo rzadko opisywane w literaturze.

W H2. – w pracy podjęto próbę oceny występowania *C. botulinum* w próbkach miodu pozyskiwanych bezpośrednio z pasiek zlokalizowanych na terenie wszystkich polskich województw. W opracowaniu wykazano, że poziom występowania *C. botulinum* w miodzie z polskich pasiek oszacowano na poziomie 2% (5/240). Podobny udział procentowy próbek pozytywnych stwierdzano w miodach szwedzkich-2%; tureckich – 2,7% i tajskich-1,3%. Na podstawie przeprowadzonych badań i oceny wyników uznać można, że poziom zanieczyszczenia zarodnikami *C. botulinum* może zależeć od regionu, w którym zbierane są próbki miodu oraz aspektów higienicznych całego procesu. Według niektórych autorów do najważniejszych czynników wpływającymi na obecność przetrwalników *C. botulinum* są: rozmiar ekstraktora, noszenie tego samego obuwia na zewnątrz i w pomieszczeniu ekstrakcji, dostępność urządzeń do mycia rąk w pomieszczeniu ekstrakcji oraz obecność *C. botulinum* w próbkach gleby (różna w zależności od regionu, teoretycznie wyższa na terenach podmokłych, bagnistych). Ponadto, zmienność cech fenotypowych wśród szczepów, obecność cichych

genów BoNT oraz wysokie prawdopodobieństwo utraty toksynotwórczości w procesie hodowli (poprzez kolejne pasażę hodowli) utrudniają wykrywanie *C. botulinum*.

W H3. – w kolejnej pracy podjęto próbę oszacowania skali występowania *Clostridium* spp., a w szczególności *C. perfringens* w próbkach miodu zebranych na terenie całej Polski. Uzyskane wyniki potwierdzają powszechne występowanie zanieczyszczenia próbek miodu przez przetrwalniki *Clostridium* spp., a także znaczny odsetek próbek zanieczyszczonych przez szczepy *C. perfringens*. W literaturze, występowanie *Clostridium* opisywane jest głównie w odniesieniu do *C. botulinum* i ryzyka wystąpienia botulizmu u niemowląt. Dane literaturowe związane z higienicznymi aspektami pozyskiwania miodu i występowania *C. perfringens* stanowią rzadkość. Raporty dotyczące obecności *C. perfringens* typu A w miodzie bardzo rzadko pojawiają się w literaturze. Niektóre z izolatów, wykazywały obecność genów warunkujących wytwarzanie toksyny. Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy wskazały na występowanie tego gatunku w 27,5% próbek. *Clostridium perfringens* powszechnie występuje w przyrodzie, także w próbkach miodu, gdzie ze względu na wysokie stężenie cukrów prostych i wysokie ciśnienie osmotyczne możliwe jest bytowanie jedynie przetrwalników. Warto wspomnieć, że w większości przypadków mikroorganizm ten nie stanowi zagrożenia epidemiologicznego, ale może być przyczyną zatruc pokarmowych o lekkim przebiegu.

W H4. – w niniejszej pracy, przedstawiono ocenę wspomnianych próbek pod kątem występowania beztlenowych laseczek przetrwalnikujących, a w szczególności *C. botulinum* i *C. perfringens*. Spośród 197 próbek *C. botulinum* stwierdzono tylko w jednej (0,5%). Wyizolowany szczep tego patogenu wykazał obecność genów *bont/a* i *ntnh*. Odsetek próbek zanieczyszczonych *C. botulinum* wydaje się być niższy niż w miodach polskich opisywanych w pracach **H1** i **H2**, a także stosunkowo niższy od odsetka opisywanego w innych publikacjach. Najwyższy odsetek próbek zanieczyszczonych przez *Clostridium* spp. został odnotowany w próbkach z prowincji Wschodniego Kazachstanu (12/23 – 48%). *Clostridia* izolowano z 10/23 próbek miodu gryczanego (43,5%), 8/23 próbek miodu ziołowego (35%), 4/23 (17%) próbek miodu wielokwiatowego i z 1/23 (4,5%) próbki miodu koniczynowego. Najwięcej izolatów *Clostridium* spp. wykryto w próbkach miodu gryczanego 10/26 (38%). Miód ten został uznany przez Różańską i wsp. w 2011 (prowadzących analizę jakości mikrobiologicznej polskiego miodu) jako jeden z najbardziej zanieczyszczonych beztlenowcami. Odnotowany odsetek korelował z wynikiem uzyskanych w ramach pracy innych autorów (Różańskiej i wsp., 2011) - wynosił 32,5% badanych próbek dodatnich. Jak już było wspomniane w poprzednich pracach

dr Tomasz Grendy stwierdził, że poziom zanieczyszczenia miodu przez *C. botulinum* może zależeć od regionu zbioru oraz aspektów higienicznych związanych z procesem zbioru.

Przypadki zatrucia jadem kiełbasianym u niemowląt mogą potencjalnie pojawić się na obszarze wschodniego Kazachstanu, gdzie działalność rolnicza jest najbardziej dynamiczna, a rozmieszczenie przetrwalników *Clostridium* spp. wydaje się największe. Przypadki botulizmu niemowląt na tym obszarze nie były jednak zgłaszane do chwili obecnej.

Uzyskane wyniki badań wskazywały na wysoką częstość występowania przetrwalników *C. perfringens* w miodzie kazachskim. Stwierdzono, że *C. perfringens* typu A występował w 9% badanych próbek. Grenda i wsp, (H3: 2017) odnotowali występowanie *C. perfringens* w 27,5% (66/240) próbek miodu pozyskiwanego z polskich pasiek po procesie ekstrakcji. Dalsze badania nad izolatami *C. perfringens* z próbek miodów powinny być ukierunkowane na różnorodność genetyczną i jej porównanie pomiędzy różnymi regionami pochodzenia.

Warto jest podkreślić, że Kazachstan nie był eksplorowany pod kątem występowania i epidemiologii patogenów z rodzaju *Clostridium* bytujących w środowisku, także w miodzie. Niniejsza praca stanowiła pierwsze tego typu opracowanie, poruszające problem występowania przetrwalników z rodzaju *Clostridium* w miodzie Kazachskim.

W H5. – w pracy podjęto się oceny zanieczyszczenia przetworzonego białka zwierzęcego pochodzenia owadziego (IPAP) oraz pasz z ich dodatkiem przez *Clostridium* spp. Badania prowadzono przesiewowo pod kątem występowania patogennych gatunków z rodzaju *Clostridium*, a w szczególności *C. botulinum*.

Opisane wyniki w pracy, wskazują na wyższe zanieczyszczenie przez *Clostridium* spp. pasz z dodatkiem IPAP w porównaniu do pasz kontrolnych. Dokonana w ramach niniejszej pracy charakterystyka szczepów z rodzaju *Clostridium* spp. przy zastosowaniu sekwencjonowania amplikonów 16S rRNA wskazała na występowanie w próbkach pasz z udziałem białka owadziego szczepów z sekwencjami charakterystycznymi dla gatunków: *C. botulinum*, *C. sporogenes*, *C. tepidum*, *C. sartagoforme*, *P. bifermentans* (najczęściej uzyskiwany wynik), *P. sulfidigenes*, *P. benzoelyticum* i *P. sordelli*. Oprócz *C. botulinum*, wśród wymienionych gatunków, szczepy *C. sporogenes*, *P. bifermentans* i *P. sordelli* mogą być patogenne i powodować poważne komplikacje zdrowotne u ludzi i zwierząt.

Mając na uwadze bezpieczeństwo mikrobiologiczne IPAP, w łańcuchu żywnościowym i rozszerzenie możliwości jego wykorzystania w żywieniu zwierząt gospodarskich, zasadne jest

przeprowadzenie holistycznej oceny analizy ryzyka związanego z występowaniem gatunków zdolnych do produkcji toksyn botulinowych, aby zapewnić bezpieczeństwo i zrównoważony rozwój przetwórstwa produktów z IPAP.

W H6. – To epidemiologiczna ocena występowania botulizmu zwierząt w Polsce oraz trudności analityczne w wykrywaniu *C. botulinum*.

Kolejnym bardzo ważnym opracowaniem, z punktu widzenia przedstawionych problemów w cyklu publikacji dr. Tomasza Grendy jest epidemiologia i występowanie *Clostridium* spp. Praca poświęcona jest botulizmowi bydła. Botulizm zwierząt gospodarskich (bydło) – jest powodem istotnych strat ekonomicznych i zaburzającym bezpieczeństwo w łańcuchu żywnościowym. Przyczyną tego schorzenia u zwierząt są klostridia produkujące toksyny botulinowe, w szczególności *C. botulinum* typów C, D oraz odmian mozaikowych CD i DC. Praca przeglądowa miała przybliżyć aspekty epidemiologiczne oraz mechanizmy pojawiania się botulizmu bydła w Polsce. Podobne mechanizmy i objawy schorzenia występują także u innych gatunków zwierząt.

W H7. – to kompleksowa analiza występowania przypadków botulizmu zwierząt w Polsce odnotowanych w latach 2019-2021. Poruszany temat w pracy to przede wszystkim diagnostyka laboratoryjna botulizmu zwierząt, a także problemów związanych z interpretacją wyników laboratoryjnych i obserwacji klinicznych oraz trudności w wykrywaniu *C. botulinum* i produkowanych przez ten patogen toksyn.

Botulizm występuje zarówno u zwierząt dzikich jak i domowych. Wśród zwierząt gospodarskich przypadki zatrucia jadem kiełbasianym są odnotowywane najczęściej u bydła, drobiu i zwierząt futerkowych. W latach 2019 – 2021 odnotowano 10 przypadków botulizmu zwierząt w Polsce. W zależności od liczby chorych zwierząt, niektóre przypadki miały charakter sporadyczny, gdzie obserwowano zachorowania pojedynczych osobników, a część z nich przybierała formę epidemii trudnych do opanowania.

Badania, prowadzono przy zastosowaniu testu biologicznego na myszach (MBA) po uzyskaniu zgody na przeprowadzanie doświadczeń wydaną przez Lokalną Komisję Etyczną w Lublinie. Test ten miał na celu, wykrywanie toksyn botulinowych i określanie ich serotypu przy zastosowaniu odpowiednich antytoksyn. Z hodowli płynnej, po etapie przednamnażania, jak i z kolonii wyrosłych na pożywkach różnicujących ekstrahowano DNA, który mrożono w 20°C lub bezpośrednio poddawano analizie PCR. Analizy PCR prowadzono przy zastosowaniu metod umożliwiających amplifikację fragmentów genów *ntnh* oraz *bont x* /A-F.

Połowę z wymienionych przypadków (50%) zaobserwowano w okresie letnim (od czerwca do września) przy średniej temperaturze powyżej 15°C. Jedynie 1 przypadek odnotowano w październiku ze średnią temperaturą powyżej 10°C, 3 przypadki zaobserwowano w listopadzie i ze średnią temperaturą powyżej 5°C i 1 przypadek w okresie zimowym, w lutym ze średnią temperaturą ok. 3°C.

Spośród rozpatrywanych zachorowań tylko 4/10 (40%) zostało potwierdzonych laboratoryjnie, na podstawie pozytywnych wyników PCR i/lub MBA. Pozostałe przypadki – 6/10 (60%) uznano za prawdopodobne i pomimo charakterystycznych objawów obserwowanych klinicznie nie odnotowano wyników pozytywnych PCR i MBA. W 4/10 (40%) badanych przypadkach możliwe było wykrycie toksyny botulinowej w surowicy i ekstraktach z wątroby. W 3/10 (30%) badanych przypadkach możliwe było wykrycie genów *ntnh* i *bont* w próbkach wątroby. W analizowanym przypadku botulizmu u kurcząt brojlerów, przetrwalniki *C. botulinum* wykryto w wodzie pochodzącej z poideł. W jednym przypadku u nerek możliwa była detekcja przetrwalników *C. botulinum* w karmie dla nerek (odpady poubojowe). Wspomnianą karmę i wodę uznano za źródło przetrwalników *C. botulinum*. Izolacja szczepów *C. botulinum* była możliwa tylko w trzech przypadkach, a wymienione izolaty zostały zaklasyfikowane do toksotypu C przy zastosowaniu real-time PCR do wykrywania genów *ntnh* i *bont*.

Wszystkie próbki analizowane w ramach niniejszej pracy były powiązane z przypadkami botulizmu zwierząt. Nie każdy z odnotowanych przypadków został potwierdzony wynikami laboratoryjnymi (Tylko 4 na 10 – 40%).

Diagnostyka laboratoryjna botulizmu to bardzo złożony i problematyczny proces, który powinien być ukierunkowany na różnego rodzaju metody i próbki. Zgłaszanie przypadków zatrucia jadem kiełbasianym zwierząt w Polsce nie jest oficjalnie kontrolowane, dlatego trudno jest zebrać dane związane z potencjalnymi źródłami lub dokładną liczbą zwierząt dotkniętych tą chorobą. Niniejsza praca to pierwsze w Polsce badanie opisujące laboratoryjną diagnostykę zatrucia jadem kiełbasianym zwierząt i problemów z tym związanych. Występowanie botulizmu zwierzęcego w Polsce jest nadal niedoceniane.

Z przeprowadzonych badań wyciągnięto następujące wnioski:

1. Środki spożywcze, w szczególności miód pozyskiwany bezpośrednio z pasiek, charakteryzuje znaczący odsetek próbek zanieczyszczonych przetrwalnikami *C. perfringens* (14%) oraz *C. botulinum* (2,3%).

2. Miody polskie i kazachskie pozyskiwane bezpośrednio z pasiek wykazują znaczną częstotliwość obecności przetrwalników z rodzaju *Clostridium*, w szczególności *C. perfringens*, ale także sporadyczną obecność *C. botulinum*. Istnieje potrzeba analizy ryzyka występowania patogennych przedstawicieli rodzaju *Clostridium* w procesie produkcji miodów.
3. Szczepy fenotypowo-podobne do *C. botulinum* izolowane z żywności i pasz wymagają szczególnej uwagi, ze względu na potencjalną patogenność. Mogą one także stwarzać trudności w postępowaniu laboratoryjnym związanym z diagnostyką botulizmu.
4. Przetworzone białko zwierzęce pochodzenia owadziego - IPAP stosowane w żywieniu zwierząt jako materiał paszowy, powinno być przedmiotem szerszych badań i oceny ryzyka, ze względu na podwyższony poziom zanieczyszczenia beztlenowymi laseczkami przetrwalnikującymi z rodzaju *Clostridium*.
5. Diagnostyka laboratoryjna i ocena sytuacji epidemiologicznej botulizmu u zwierząt w Polsce wymaga wdrożenia kompleksowego i precyzyjnego postępowania bazującego na obserwacjach klinicznych, pobieraniu próbek od osobników wykazujących objawy, oraz w jak najkrótszym czasie poddaniu ich badaniu pod kątem obecności toksyny, a także przetrwalników *C. botulinum*. Spójna procedura pobierania próbek i postępowania laboratoryjnego przyczyniłaby się do sprawniejszej diagnostyki botulizmu u zwierząt oraz zapewnienia wyższego poziomu bezpieczeństwa w łańcuchu żywnościowym.

Podsumowując, recenzowane prace wskazane przez Habilitanta jako osiągnięcia naukowe, które są podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego, oceniam jako interesujące, użyteczne i wartościowe opracowanie naukowe. Oryginalność naukowa oraz wkład twórczy Dysertanta w rozwój dyscypliny weterynaria, przesądzają w mojej opinii, zaproponowane w nim metody oceny występowania *Clostridium* spp., w szczególności *C. botulinum* i *C. perfringens* w łańcuchu żywnościowym.

Ocena aktywności naukowej

Dorobek naukowy dr Tomasza Grendy w przedstawionym autoreferacie obejmuje razem **58** prac, w których jest autorem lub współautorem. Liczba prac opublikowanych w czasopiśmie z bazy Journal Citation Report (JRC) wynosi **27**, w tym **2** prace przed uzyskaniem stopnia doktora oraz **25** (w tym **7** stanowiących „osiągnięcie”) po uzyskaniu stopnia doktora. W dorobku Dysertanta znajdują się również **23** publikacje w czasopiśmie spoza bazy Journal Citation Report, w tym między innymi przed uzyskaniem stopnia doktora jest ich **12** i po

uzyskaniu stopnia doktora w tym przypadku to **11** opublikowanych prac. Do dorobku naukowego można doliczyć również **8** rozdziałów w monografiach naukowych, w tym przed uzyskaniem stopnia doktora **1** oraz po uzyskaniu stopnia doktora **7**.

Suma wszystkich punktów MEiN (wcześniejsza nazwa MNiSW, liczona zgodnie z rokiem opublikowania) wynosi **1617**, w tym **42** przed uzyskaniem stopnia doktora naukowego. Natomiast po uzyskaniu stopnia doktora liczba punktów wynosi **1575** a w tym stanowiących osiągnięcie habilitacyjne **480** punktów.

Sumaryczny Impact Factor (liczony zgodnie z rokiem publikowania) wg bazy Journal Citation Reports wynosi **50,071**. W tym przed uzyskaniem stopnia doktora naukowego stanowi **0,539** po uzyskaniu stopnia doktora naukowego wynosi **49,532**. Impact Factor dla prac naukowych stanowiących w tym osiągnięcie habilitacyjne wynosi **12,523**. Liczba cytowań według bazy Web of Science Core Collection jest **103** (bez autocytowań 71) natomiast liczba cytowań według bazy Scopus wynosi **108** (bez autocytowań 80). W przypadku dr Tomasza Grendy Indeks Hirscha według bazy Web of Science Core Collection oraz według bazy Scopus będzie taki sam i będzie wynosił **7**.

W przedstawionej przez Habilitanta pracy naukowej, brakuje informacji kto był promotorem pracy magisterskiej obronionej na Wydziale Nauk o Żywności i Biotechnologii, Akademia Rolnicza w Lublinie, jak również rozprawy doktorskiej która odbyła się w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach. W autoreferacie brakuje formy zakończenia studium podyplomowego, na w Akademii Rolniczej w Lublinie (obecnie: Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie).

W przedstawionym przez Dysertanta autoreferacie, w części poświęconej omówieniu celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania, można czytając dostrzec wiele niedociągnięć. Przede wszystkim brakuje wybranych, cytowanych autorów w spisie piśmiennictwa (Grenda i Kwiatek, 2009); (Nevas i wsp., 2006); (Różańska i wsp., 2011); (Goldsztein i wsp., 2020) czy (Zhang i wsp., 2008). Piśmiennictwo zamieszczone w autoreferacie przez Dysertanta wymaga uszczegółowienia. W pracy zdarzają się również drobne potknięcia stylistyczne.

We wszystkich pracach, będących jednotematycznym cyklem 7 publikacji, Habilitant jest pierwszym autorem, współautorem oraz autorem korespondencyjnym. Swoje wkład, polegający na czynnym udziale we wszystkich etapach procesu wydawniczego artykułów niestety nie został przedstawiony i oceniony procentowo. Zgodnie jednak z deklaracjami współautorów,

udział dr. Tomasza Grendy w poszczególnych pracach był decydujący dla ich ostatecznej formy i dlatego może być uwzględniony jako zasadnicza część osiągnięcia naukowego. Oceniane prace są powiązane tematycznie, ponieważ omawiają poważny problem oceny występowania *Clostridium* spp., w szczególności *C. botulinum* i *C. perfringens* w próbkach żywności polskich producentów, miodach z polskich i kazachskich pasiek oraz w paszach z dodatkiem nowych materiałów paszowych IPAP oraz epidemiologicznej oceny występowania botulizmu zwierząt w Polsce, wraz z towarzyszącymi trudnościami analitycznymi w wykrywaniu *C. botulinum*.

W przedstawionej ocenie naukowej Dysertant prezentuje tabelaryczne zestawienie swojego dorobku naukowego. Z listy publikacji rozpisanej w sposób bardzo jasny i przejrzysty wynika, że dr. Tomasz Grenda zdecydowanie powiększył swój dorobek naukowy o 22 prace naukowe i kolejnych 6 współautorskich monografii w opracowaniach zbiorowych. Dorobek ten był realizowany w ramach prac naukowych po uzyskaniu stopnia doktora nauk weterynaryjnych. Większość prac to prace oryginalne, indeksowane w czasopismach międzynarodowych znajdujących się w bazie danych JCR będących jednotematycznym cyklem publikacji, które powstały właśnie w tym okresie.

Tematyka badawcza stanowiąca osiągnięcie habilitacyjne przez dr. Tomasz Grendę wskazuje na problem w zakresie występowania patogennych przedstawicieli *Clostridium* spp. w różnych próbkach we wszystkich etapach łańcucha żywnościowego.

Do ważniejszych osiągnięć, w tym cyklu monotematycznych publikacji można zaliczyć fakt, że opracowano i zastosowano szerokie spektrum metod laboratoryjnych, takich jak: testy biologiczne na myszach – MBA, techniki PCR i real – time PCR oraz sekwencjonowanie Sangera, co w dużym stopniu umożliwiło charakterystykę mikroflory beztlenowej z rodzaju *Clostridium* izolowanych między innymi z środków spożywczych, w szczególności miodów. Uznaje się, że poziom zanieczyszczenia zarodnikami *C. botulinum* może zależeć od regionu, w którym zbierane są próbki miodu oraz od aspektów higienicznych całego procesu w łańcuchu żywnościowym. Miody były pozyskiwane bezpośrednio z pasiek polskich i kazachskich, w których wykazano, że charakteryzują się dużym odsetkiem próbek zanieczyszczonych przetrwalnikami z rodzaju *Clostridium*, w szczególności *C. perfringens* (14%) ale także sporadyczną obecność *C. botulinum* (2,3%).

Dzięki tego rodzaju badaniom i opracowanym wyżej wymienionym metodom wykryto szczepy fenotypowo-podobne do *C. botulinum*, które nie wykazywały obecności genów *ntnh* lub *bont*. Na podstawie analizy 16S rDNA, sekwencje tych genów były najbardziej podobne do

odpowiadającym im sekwencjom z bazy GenBank należącym do *C. botulinum* i *C. sporogenes*. Zastosowana metoda identyfikacji genów 16S rDNA umożliwiła odróżnienie podejrzanych izolatów do poziomu rodzaju i tylko w przybliżeniu do gatunku. Spośród 6 szczepów wykazujących wysokie podobieństwo (na poziomie 98-99%) do *C. botulinum*, tylko 5 zakwalifikowano do *C. botulinum* na podstawie analiz real-time PCR, mPCR oraz testu biologicznego na myszach. Warto zauważyć, że zmienność cech fenotypowych wśród szczepów, obecność cichych genów *bont* oraz wysokie prawdopodobieństwo utraty toksynotwórczości w procesie hodowli (poprzez kolejne pasażę hodowli) utrudniają wykrywanie *C. botulinum*.

Wspomniany zestaw opisanych metod pozwala na detekcję genów *ntnh* i *bont*, a także określanie ekspresji genów NTNH które są wspólne dla wszystkich szczepów *Clostridium* zdolnych do wytwarzania toksyn botulinowych.

Jednoczesna analiza w kierunku obu wspomnianych genów pozwala na uniknięcie wyników fałszywie dodatnich związanych z występowaniem produktów niespecyficznych.

Na szczególną uwagę w dorobku naukowym Habilitanta zasługuje również fakt wyróżnienia pracy pt. „*Clostridium botulinum* and *Clostridium perfringens* Occurrence in Kazakh Honey Samples” wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego. Jest to pierwsze tego typu opracowanie, poruszające problem występowania przetrwalników z rodzaju *Clostridium* w miodzie Kazachskim. Publikacja została wyróżniona przez redakcję czasopisma *Toxins* statusem „Editor’s Choice” (Status „Editor’s Choice” oparty jest na rekomendacjach redaktorów naukowych czasopism MDPI z całego świata. Redaktorzy wybierają niewielką liczbę artykułów opublikowanych w czasopiśmie, które ich zdaniem będą szczególnie interesujące dla czytelników lub ważne w danej dziedzinie. Celem jest wyróżnienie niektórych z najbardziej interesujących prac opublikowanych w różnych obszarach badawczych czasopisma).

Dlatego istnieje potrzeba analizy ryzyka występowania patogennych przedstawicieli rodzaju *Clostridium* w procesie produkcji miodów i na każdym etapie łańcucha żywnościowego.

Ważnym osiągnięciem w pracy naukowej Habilitanta, jest analiza i ocena *C. botulinum* i *C. perfringens* w próbkach żywności pozyskanych od polskich producentów. Dlatego szczepy fenotypowo-podobne do *C. botulinum* izolowane z żywności i pasz wymagają szczególnej uwagi, ze względu na potencjalną patogenność. Z drugiej strony istotnym wydaje się zwrócenie uwagi na trudności analityczne i diagnostyczne w wykrywaniu *C. botulinum*, które są związane m.in. z niskim poziomem zanieczyszczenia oraz możliwością rozwoju mikroorganizmów o

niższych wymaganiach metabolicznych np. *C. perfringens*. Narzędzie mikrobiologii predyktywnej, tj. Model Combase (<http://www.combase.cc>) wskazuje, że liczba *C. perfringens* może się podwoić w ciągu około 50 minut w 30°C (pH 5, aw = 0,997), natomiast liczba komórek *C. botulinum* po czasie około 154 min., co sprzyja uzyskiwaniu wyników fałszywie negatywnych. Dlatego też ważne jest pozyskiwanie DNA już na etapie przednamnażania. Pozwala to także na uzyskanie wyższego prawdopodobieństwa wykrycia genów warunkujących wytwarzanie toksyn botulinowych przed utratą właściwości toksynotwórczych, która jest możliwa w wyniku horyzontalnego transferu genów. Testy biochemiczne nie zapewniają rozróżnienia pomiędzy szczepami *C. botulinum*, a izolatami spokrewnionymi do tego gatunku np. *C. sporogenes*. Całkowite oszacowanie liczby przetrwalników *Clostridium*, która może wywołać botulizm, lub inne schorzenia związane z oddziaływaniem patogennym przedstawicieli tego rodzaju, nie jest określona. Uznaje się, że już 1 spora *C. botulinum* może przyczynić się do wystąpienia zatrucia jadem kiełbasianym u najmłodszych dzieci. Dlatego tego rodzaju badania, które zostały przeprowadzone i opisane w osiągnięciach dr Tomasz Grendy sugerują potrzebę prowadzenia ciągłej i szczegółowej analizy ryzyka, obejmującej każdy etap pobierania miodu, związaną z prawdopodobieństwem wystąpienia botulizmu niemowląt po jego spożyciu.

Do równie ważnych osiągnięć w monotematycznym cyklu publikacji można zaliczyć fakt, oceny stopnia zanieczyszczenia przetworzonego białka zwierzęcego pochodzenia owadziego (IPAP) oraz pasz z ich dodatkiem przez *Clostridium* spp. z punktu widzenia obecności *Clostridium* spp. w łańcuchu żywnościowym i epidemiologii u zwierząt.

Pomimo zalet związanych z włączeniem przetworzonego białka zwierzęcego pochodzenia owadziego (IPAP) do diety zwierząt gospodarskich istnieją obawy dotyczące ich bezpieczeństwa. Niektóre owady uwalniają toksyczne substancje chemiczne jako mechanizm obronny. Wiele gatunków powoduje reakcje alergiczne i może przyczynić się do niedoboru tiaminy. W wielu opublikowanych pracach opisano również szereg schorzeń bakteryjnych i wirusowych, wśród których można wymienić właśnie botulizm, gruźlica bydła, grypa typu A, pasożyty wywołane entomofagią, które w większości przypadków są obserwowane w środowisku naturalnym a nie po skarmianiu zwierząt IPAP pochodzącym od owadów hodowlanych.

Powyższe publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego Habilitanta wskazują, że IPAP czyli przetworzone białko zwierzęce pochodzenia owadziego - stosowane w żywieniu zwierząt jako materiał paszowy powinno być przedmiotem szerszych badań i oceny ryzyka ze względu

na podwyższony poziom zanieczyszczenia beztlenowymi laseczkami przetrwalnikującymi z rodzaju *Clostridium*.

Przedstawiony cykl prac, stanowiących osiągnięcie habilitacyjne Dysertanta wskazuje, że w wyniku przeprowadzonej kompleksowej analizy, diagnostyka laboratoryjna i ocena sytuacji epidemiologicznej botulizmu u zwierząt w Polsce wymaga potrzebę stworzenia i wdrożenia szczegółowego i precyzyjnego postępowania bazującego na obserwacjach klinicznych, pobieraniu próbek od osobników wykazujących objawy, oraz w jak najkrótszym czasie poddaniu ich badaniu pod kątem obecności toksyny, a także przetrwalników *C. botulinum*. Spójna procedura pobierania próbek i postępowania laboratoryjnego przyczyniłaby się do sprawniejszej diagnostyki botulizmu u zwierząt oraz zapewnienia wyższego poziomu bezpieczeństwa w łańcuchu żywnościowym.

Warto również wspomnieć, że dr Tomasz Grenda w ramach innych zainteresowań badawczych niezwiązanych z cyklem wchodzącym w skład „osiągnięć”, zajmował się głównie wykrywaniem *C. botulinum* w paszach i żywności metodami biologii molekularnej. Było to zagadnienie pracy doktorskiej. W ramach jednej z tych prac opisał wyniki walidacji metody multiplex PCR z detekcją na żelu agarozowym do wykrywania *C. botulinum* typów A, B, E oraz F w próbkach żywności i pasz. Określając w ten sposób charakterystyczne parametry dla procedury jakościowej tj.: granicę wykrywalności wyrażoną jako LOD50 zgodnie z metodą Spearmana-Kärbera, a także specyficzność, czułość i dokładność według normy PN-EN ISO 16140:2004.

Dr Tomasz Grenda zwalidował również procedurę opartą na wykrywaniu *C. botulinum* C i D w próbkach pasz. W trakcie walidacji określił specyficzność metody, czułość i dokładność zgodnie z normą PN – EN ISO 16140:2004. Ponadto specyficzność walidowanych metod została potwierdzona poprzez analizę sekwencji produktów PCR uzyskanych z badań próbek związanych z przypadkami zatrucia jadem kiełbasianym u bydła i kaczek krzyżówek. Opisał również możliwości zastosowania zwalidowanych metod do wykrywania *C. botulinum* w karmach dla nerek (bazujących na odpadach poubojowych z ferm drobiu), które często są uznawane za przyczyny botulizmu u tych zwierząt. W ramach pracy przeglądowej przedstawił metody oparte na technikach laboratoryjnych, testach biologicznych, technikach immunologicznych, chromatografii i PCR, a także metody genotypowania stosowane w dochodzeniach epidemiologicznych oparte na technikach PFGE, RFLP, AFLP. Wymienione techniki zostały ocenione pod kątem ich przydatności w badaniu próbek, genotypowaniu szczepów oraz diagnostyce botulizmu.

Kandydat był również zaangażowany w badania nad występowaniem *C. perfringens* w kiszoncek. Badania dotyczyły 305 kiszonek pobieranych bezpośrednio z gospodarstw rolnych zlokalizowanych na terenie wszystkich polskich województw. Na podstawie wykonanych badań stwierdzono, że ograniczeniu zanieczyszczenia kiszonek przez *Clostridium* spp. można zapobiec poprzez prawidłowo przeprowadzony proces zakiszania z dodatkiem kultur starterowych, ale obecność przetrwalników zależy głównie od produkcji pierwotnej i stopnia zanieczyszczenia użytych materiałów paszowych.

W ramach zainteresowań dr. Tomasz Grenda uczestniczył również w badaniach nad jakością mikrobiologiczną mieszanek paszowych. Analizy były wykonywane we wszystkich laboratoriach ZHW i obejmowały występowanie *Salmonella* spp. oraz oznaczanie liczby bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, liczby mezofilnych bakterii tlenowych oraz ogólnej liczby drobnoustrojów i grzybów. Analizy przeprowadzane były przy zastosowaniu polskich, europejskich i międzynarodowych norm metodycznych. Wyniki badań wykazały, że jakość mikrobiologiczna mieszanek paszowych stosowanych w Polsce w latach 2007-2010 była lepsza niż jakość pasz stosowanych w latach 2003-2006. Analizowano także materiały paszowe pod kątem występowania i zanieczyszczenia przez *Salmonella* spp., oznaczano liczbę *Enterobacteriaceae*, liczbę tlenowych bakterii mezofilnych, szacowano całkowitą liczbę drobnoustrojów, liczbę grzybów oraz poziom zanieczyszczenia przez *Clostridium* spp. i *Bacillus cereus*. Badania przeprowadzono w latach 2009 – 2012 we wszystkich laboratoriach diagnostycznych ZHW podlegających Inspekcji Weterynaryjnej. Analizy wykonano zgodnie z międzynarodowymi i polskimi normami stosowanymi w mikrobiologii żywności i pasz. *Salmonella* spp. były najczęściej wykrywane w nasionach oleistych.

Podsumowując, zgadzam się z sformułowanymi przez dr Tomasza Grendę najważniejszymi osiągnięciami opisanych ocen i analiz badań w jednotematycznym cyklu prac i poza nimi, mimo wskazania kilku drobnych potknięć. Podjęte tematy badawcze przez Pana dr. Tomasza Grendę polegały na ocenie i analizie obecności *Clostridium* spp. stanowią kontynuację tematyki rozpoczętej już w pracy doktorskiej, której problemem badawczym było również między innymi wykrywanie *Clostridium botulinum* w paszach i żywności metodami biologii molekularnej. Dorobek naukowy dr Tomasza Grendy, to przede wszystkim jednolita problematyka oceny i analizy badawczej. Przedstawione badania dają podstawę dla potrzeb praktycznych (użytkarnych) rozwiązań. Badania, te stanowią dużą wartość nie tylko poznawczą, ale i wdrożeniową. Można stwierdzić, że do ich przeprowadzenia Habilitant opanował w sposób doskonały kunszt (procedury) badawczy. Uzyskane wyniki znajdują

miejsce jako uzupełnienie danych w piśmiennictwie światowym w zakresie występowania i znaczenia epidemiologicznego w łańcuchu żywnościowym, patogennych klostridiów

Reasumując, warto podkreślić, że stanowiące podstawę habilitacyjną cykl 7 prac dr. Tomasza Grendy jest oryginalnym i wartościowym osiągnięciem naukowym.

Ocena osiągnięć organizacyjnych

Pan dr Tomasz Grenda w ramach referencyjnej działalności laboratorium mikrobiologicznego Zakładu Higieny Pasz, zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 27 lipca 2022 r., w sprawie krajowych laboratoriów referencyjnych, jest współodpowiedzialny za organizację i koordynowanie spotkań z laboratoriami urzędowymi, a także badań biegłości w zakresie zanieczyszczeń mikrobiologicznych pasz.

Jako „*Guest Editor*” od września 2022 jest współodpowiedzialny za organizację numeru specjalnego pt. "*Diversity, occurrence and distribution of foodborne pathogens in food chain*" w czasopiśmie „*Diversity*” (ISSN: 1424-2818, IF=3,029, Q2).

Pan dr Tomasz Grenda jest członkiem Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych.

Habilitant był współautorem w sumie 43 referatów i doniesień zarówno w okresie przed i po uzyskaniu stopnia doktora, zaprezentowanych na konferencjach, sympoziach i kongresach naukowych, krajowych i międzynarodowych.

Od 2008 roku Dysertant brał czynny udział w krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych:

- XXXII Konferencja Naukowo – Techniczna pt. „Ocena Jakości i Bezpieczeństwa Pasz”;
- XXXIII Konferencja Naukowo-Techniczna „Materiały, mieszanki i dodatki paszowe - ocena bezpieczeństwa i jakości”;
- XXXIV Konferencja Naukowo-Techniczna „Ocena jakości pasz”;
- Konferencja pt.: Bezpieczeństwo Żywności i Wody-Nowe Trendy i Techniki Badawcze;
- VetForum 9. Kongres Praktyki Weterynaryjnej;
- XIII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2021;
- XIV Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Tygiel 2022;
- XVI Międzynarodowa Konferencja KRMIVA 2009, Opatija, Chorwacja;
- XVIII Międzynarodowa Konferencja KRMIVA 2011, Opatija, Chorwacja;
- XXII Międzynarodowa Konferencja KRMIVA 2015, Opatija, Chorwacja;
- XXIII Międzynarodowa Konferencja KRMIVA 2016, Opatija, Chorwacja;
- XIII Kongres PTNW „Od nauki do praktyki”, Olsztyn 2008;
- Jubileuszowa Konferencja „Biologia molekularna w diagnostyce chorób zakaźnych i biotechnologii”, SGGW, Warszawa 2009;

- Konferencja „Biologia molekularna w diagnostyce chorób zakaźnych i biotechnologii”, SGGW, Warszawa 2010;
- Kongres Nauk Rolniczych Nauka – Praktyce „Przyszłość Sektora Rolno-Spożywczego i Obszarów Wiejskich”, Puławy 2009;
- "Botulism Workshop", Med-Vet-Net Association; ANSES Headquarter Maisons Alfort, Francja;
- Recent Advances in Food Analysis, 9th International Symposium; Praga, Czechy;
- Feed 2021, International Feed Conference; Wiedeń, Austria;
- XVI Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, Warszawa 2021.

Dr Tomasz Grenda jest również laureatem kilku nagród oraz wyróżnień jak:

1. Polskie Towarzystwo Nauk Weterynaryjnych - Nagroda II stopnia Za pracę oryginalną opublikowaną w zespole międzynarodowym w zagranicznym czasopiśmie z listy JCR: H4. Balgabay Maikanov, Mustafina Raikhan, Auteleyeva Laura, Wiśniewski Jan, Anusz Krzysztof, Grenda Tomasz, Kwiatek Krzysztof, Goldsztejn Magdalena, Grabczak Magdalena. Clostridium botulinum and Clostridium perfringens Occurrence in Kazakh Honey Samples. Toxins, 2019, 11, 472; [doi:10.3390/toxins11080472](https://doi.org/10.3390/toxins11080472).

* IF: 3,531; pkt. MEiN: 100

*Niniejsza praca jest częścią cyklu stanowiącego „osiągnięcie”.

2. Grenda i wsp. Wyróżnienie za najlepszą prezentację posteru na X Jubileuszowej Konferencji pt. "Biologia molekularna w diagnostyce chorób zakaźnych i biotechnologii"; tytuł nagrodzonej pracy: "Molecular diagnostics of botulism in animals". Wyróżnienie przyznane przez Komitet Mikrobiologii Polskiej Akademii Nauk; Data i miejsce wyróżnienia: 2009.11.28, SGGW w Warszawie.

Jako kierownik oraz wykonawca, Dr Tomasz Grenda uczestniczył w okresie prawie 15 lat swojej pracy naukowej w realizacji 10 projektów badawczych:

1. Wykrywanie *C. botulinum* w paszach i żywności metodami biologii molekularnej. Projekt Promotorski finansowany ze środków MNiSW, rok: 2010 – 2012. Charakter udziału: doktorant 2. Badania nad neurotoksynami botulinowymi w aspekcie diagnostycznym. Projekt finansowany w ramach KNOW – Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący, Konsorcjum Naukowe: „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”. Projekt przeznaczony na rozwój potencjału badawczego, rok: 2015-2017. Charakter udziału: **wykonawca.**

2. Opracowanie strategii wykorzystania alternatywnych źródeł białka owadów w żywieniu zwierząt umożliwiającej rozwój jego produkcji na terenie RP. Projekt złożony wspólnie z MRiRW w ramach programu "GOSPOSTRATEG" pt.: "Społeczny i gospodarczy rozwój Polski w warunkach globalizujących się rynków", rok: 2018-2021. Charakter udziału: **wykonawca**.
3. Tworzenie bazy genetycznej polskich szczepów *C. botulinum*. KNOW – Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący, Konsorcjum Naukowe: „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność” – konkurs dla młodych naukowców, rok 2018-2019. Charakter udziału: **kierownik**.
4. Charakterystyka molekularna szczepów z rodzaju *Clostridium* izolowanych z treści jelitowej kurcząt żywionych paszami z udziałem przetworzonego białka owadziego. Projekt realizowany w ramach programu „Miniatura 6”, finansowany przez Narodowe Centrum Nauki (NCN), rok 2022-2023. Charakter udziału: **kierownik**.

Projekty badawcze własne realizowane w ramach działalności Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach:

6. Doskonalenie metod badania i oceny mikrobiologicznej pasz w odniesieniu do *Clostridium botulinum*, rok: 2010-2011, charakter udziału: **wykonawca**.
7. Ocena jakości kiszonek stosowanych w żywieniu zwierząt gospodarskich w Polsce w aspekcie ich bezpieczeństwa mikrobiologicznego, rok: 2012-2015, charakter udziału: **wykonawca**.
8. Kukier E., Grenda T., Goldsztejn M., Kwiatek K., Jedziniak P., Wiśniewska-Dmytrow H. Identyfikacja i ocena zagrożeń biologicznych i chemicznych w kiszonkach stosowanych w żywieniu zwierząt w Polsce, rok: 2016-2017, charakter udziału: **wykonawca**.

Pan dr Tomasz Grenda jest autorem 25 recenzji* prac złożonych do publikacji w czasopismach naukowych z bazy JCR oraz czasopismach spoza bazy JCR.

Kandydat brał również udział w wielu stażach podoktorskich, kursach i szkoleniach zarówno tych międzynarodowych jak i krajowych:

STAŻE ZAGRANICZNE (w latach 2016-2019)

1. 07.05.2019 – 07.08.2019 r. – Soil and Water Research Infrastructure, Biology Centre CAS Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice, Czechy – trzymiesięczny staż podoktorski;
2. 04.04.2016 – 03.10.2016 r. – Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UA, Wielka Brytania – sześciomiesięczny staż podoktorski.

SZKOLENIA ZAGRANICZNE (w latach 2009-2017)

1. 12.2017 "EMBL-EBI resources and tools for genomics"; Organizator: EMBL-EBI, Wellcome Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, CB10 1SD, UK;
2. 02.2012 Training course: "Short Term Mission" (Training on molecular biology and microbiological techniques); organizer: EPIZONE, place of training: IZSLER, Brescia (Italy);
3. 10.2009 Training course: "Science Communication"; organized in the frame of Young EPIZONE programme; place of training: Koldkaergaard Conference Center, Aarhus (Denmark);

SZKOLENIA KRAJOWE (w latach 2008-2016)

1. 12.2016 Warsztaty i szkolenie pt.: "Zastosowanie techniki NGS (Next Generation Sequencing) w mikrobiologii"; Organizator: Państwowy Instytut Weterynaryjny - PIB w Puławach;
2. 10. 2015 "Szkolenie dla osób prowadzących i nadzorujących doświadczenia na zwierzętach"; organizator: Polskie Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych - POLLASA;
3. 10.2012 "Testy Komórkowe: metody i narzędzia do analizy odpowiedzi komórkowej"; organizator: Promega oraz Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach;
4. 05.2012 "Sekwencjonowanie produktów PCR, konstruowanie drzew filogenetycznych i ich interpretacja"; organizator: Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach;
5. 10.2011 "Zapewnienie mikrobiologicznego bezpieczeństwa żywności - nowe techniki i metody"; organizator: Argenta.
6. 02.2008 " Izolacja RNA i badanie ekspresji"; organizator: Applied Biosystems oraz Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach;

7. 09.2008 "Liofilizacja - teoria i praktyka"; organizator: Christ, Donserv oraz Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach;
8. 09.2008 "Warsztaty Real - time PCR", organizator: Roche Diagnostics Poland.
9. 08.2008 "Zarządzanie Techniczne, walidacja metod i zapewnienie jakości w laboratorium mikrobiologicznym"; organizator: CE2 oraz Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach;
10. 06.2008 "Metody statystyczne w I i II linii sterowania jakością", organizator: Jan Myszewski Consulting oraz Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach;
11. 04.2008 "Szczepy referencyjne i badania biegłości w laboratorium mikrobiologicznym"; organizator: LGC Standards oraz Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach;
12. 03.2008 "7500 Real - Time PCR System Basic Training", organizator: AB Applied Biosystems oraz Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach;
13. 03.2008 "Zarządzanie jakością w laboratorium; materiały odniesienia i badania biegłości"; organizator: LGC Standards oraz Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach;
14. 03.2008 "Międzynarodowe badania biegłości i zarządzanie jakością w nauce"; organizator: CE2 oraz Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach;
15. 02.2008 "Real - Time PCR i technika HRM"; organizator: Polygen, Corbett oraz Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach.

Reasumując, oceniam jednoznacznie pozytywnie aspekt aktywności Kandydata, dotyczący jego osiągnięć dydaktycznych, organizacyjnych, popularyzujących naukę oraz z zakresu współpracy z podmiotami otoczenia zewnętrznego. Dotyczy to zarówno poziomu naukowego publikacji Kandydata, a także aktywności konferencyjnej i projektowej. Wartym jest podkreślenie udziału Dysertanta w wielu projektach badawczych. Imponującym jest również liczba staży i pobytów naukowych w krajowych i zagranicznych jednostkach naukowych, które pozwoliły na udoskonalenie warsztatu naukowego i być może nawiązywaniu współpracy.

Ocena osiągnięć dydaktycznych

Dorobek dydaktyczny dr Tomasza Grendy, który wynika z miejsca pracy i wielu obowiązków służbowych nie jest zbyt doskonały. Podkreślić jednak należy, że nie jest to główny cel tego

rodzaju instytutów resortowych. W przedstawionym do recenzji autoreferacie Habilitant przedstawia jednak informacje o osiągnięciach dydaktycznych w momencie rozpoczęcia pracy w Zakładzie Higieny Pasz PIWet-PIB w Puławach, biorąc czynny udział w opiece nad praktykantami odbywającymi obowiązkowe praktyki studenckie wynikające z regulaminu studiów. Z przedstawionych informacji wynika również, że sprawował opiekę nad młodymi pracownikami laboratorium Zakładu Higieny Pasz oraz stażystami. Dr Tomasz Grenda w ramach Wieloletniego Programu: *Krajowy program urzędowej kontroli w zakresie bezpieczeństwa pasz*, prowadzi wykłady szkoleniowe dla Inspektorów Weterynarii. W ramach jest współodpowiedzialny za coroczne szkolenia personelu laboratoryjnego skierowanego dla laboratoriów urzędowych (ZHW). Brał również czynny udział w prowadzeniu wykładów na szkoleniach specjalizacyjnych skierowanych dla lekarzy weterynarii (Specjalizacja Nr 15, Higiena zwierząt rzeźnych i żywności pochodzenia zwierzęcego). Na podstawie Uchwały Rady Naukowej, Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, jest promotorem pomocniczym przewodu doktorskiego mgr inż. Zbigniewa Osińskiego, pt. *„Substancje przeciwbakteryjne w nawozach naturalnych i organicznych – badanie i ocena ryzyka”*

Powyższe osiągnięcia dydaktyczne pozwalają na sugestię, że dr. Tomasz Grenda jest aktywny na polu dydaktycznym i wypełnia zadania przysługujące samodzielnym pracownikom PIWet-PIB w Puławach.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że aktywność naukowa, a szczególnie osiągnięcia naukowe i inne (dorobek dydaktyczny, popularyzatorski, w tym wyróżniająca się współpraca międzynarodowa) dr Tomasza Grendy spełniają w stopniu dobrym wszelkie kryteria określone zgodnie z wymaganiami na podstawie art. 219 ust.1 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742.) i wnioskuję o nadanie dr. Tomaszowi Grendzie stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie weterynaria.

Prof. dr hab. Magdalena Gajęcka