

Załącznik 2. Autoreferat

Dr inż. Katarzyna Wolny-Koładka

Kraków, Listopad 2018

I. Dane osobowe

- 1. Imię i nazwisko:** Katarzyna Wolny-Koładka
- 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania:**

Uzyskany tytuł: Magister inżynier

Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Biotechnologia – Studia Międzywydziałowe

Kierunek: Biotechnologia

Specjalność: Biotechnologia stosowana

Tytuł pracy magisterskiej: „*Streptococcus agalactiae (GBS) – charakterystyka szczepów izolowanych z dróg rodnych kobiet w okresie rozrodczym*”.

Promotor: Prof. dr hab. inż. Wiesław Barabasz

Data obrony: 23 czerwca 2009 r.

Uzyskany stopień: Doktor nauk rolniczych

Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Dziedzina: agronomia

Specjalność: mikrobiologia

Temat pracy doktorskiej: „*Bioróżnorodność i reakcja grzybów z rodzaju Fusarium na wybrane czynniki w badaniach in vitro*”. Rozprawa wyróżniona uchwałą Rady Wydziału Rolniczo-Ekonomicznego Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Promotor: Prof. dr hab. inż. Wiesław Barabasz

Recenzenci: Prof. dr hab. Zbigniew Paluszak, Dr hab. Dariusz Ropek, prof. UR

Data nadania stopnia doktora: 27 czerwca 2013 r.

- 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:**

01.10.2015 – obecnie: adiunkt naukowo-dydaktyczny w Katedrze Mikrobiologii, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

01.10.2013 – 30.09.2015: asystent naukowo-dydaktyczny w Katedrze Mikrobiologii, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

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 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Zagrożenia mikrobiologiczne występujące w środowisku ośrodków jazdy konnej z uwzględnieniem rozprzestrzeniania się lekoopornych szczepów *Escherichia coli* i *Staphylococcus* spp. oraz określenie bakteriobójczego potencjału nanocząstek srebra względem tych bakterii.

b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego (autorzy, rok wydania, tytuł publikacji, nazwa wydawnictwa)

1. **Wolny-Koładka K.*** 2018. Microbiological quality of air in free-range and box-stall stable horse keeping systems. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190:269. DOI: 10.1007/s10661-018-6644-0. **(IF 1,804; 25 pkt. MNiSW)**
2. **Wolny-Koładka K.***, Blok B., Kuś A. 2018. Właściwości mikrobiologiczne obornika w bezstajennym i boksowym systemie utrzymania koni. *Woda-Środowisko-Obszary wiejskie*, T. 18. Z. 2 (62):99-113. **(10 pkt. MNiSW)**
3. **Wolny-Koładka K.***, Lenart-Boroń A. 2018. Antimicrobial resistance and the presence of extended-spectrum-beta-lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from the environment of horse riding centers. *Environmental Science and Pollution Research*, 25:21789-21800. DOI: 10.1007/s11356-018-2274-x. **(IF 2,800; 30 pkt. MNiSW)**
4. **Wolny-Koładka K.*** 2018. Resistance to antibiotics and the occurrence of genes responsible for the development of methicillin resistance in *Staphylococcus* bacteria isolated from the environment of horse riding centers. *Journal of Equine Veterinary Science*, 61:65-71. DOI: 10.1016/j.jevs.2017.11.010. **(IF 0,882; 20 pkt. MNiSW)**

5. **Wolny-Koladka K.**, Malina D. 2017. Toxicity assessment of silver nanoparticles against *Escherichia coli* strains isolated from horse dung. *Micro & Nano Letters*, 12(10):772-776. DOI: 10.1049/mnl.2017.0129. **(IF 0,723; 15 pkt. MNiSW)**
6. **Wolny-Koladka K.***, Malina D. 2017. Silver nanoparticles toxicity against airborne strains of *Staphylococcus* spp. *Journal of Environmental Science and Health, Part A. Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 52(13):1247-1256. DOI: 10.1080/10934529.2017.1356186. **(IF 1,561; 20 pkt. MNiSW)**
7. **Wolny-Koladka K.***, Malina D. 2018. Eco-friendly approach to the synthesis of silver nanoparticles and their antibacterial activity against *Staphylococcus* spp. and *Escherichia coli*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A. Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, DOI: 10.1080/10934529.2018.1474568. **(IF 1,561; 20 pkt. MNiSW)**

*Autor korespondencyjny

Sumarycznie IF 9,331; 140 pkt. MNiSW

Oświadczenia współautorów publikacji znajdują się w załączniku 6. Opis mojego udziału, w tym procentowego, w wykonaniu powyższych prac zawiera załącznik 4, p. I B. Kopie prac zostały zebrane w załączniku 5.

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

W literaturze naukowej pojawiają się doniesienia na temat analizy zagrożeń mikrobiologicznych występujących w budynkach inwentarskich. W większości koncentrują się one na mikrobiologicznym zanieczyszczeniu powietrza obór, chlewni i kurników. Rzadko spotyka się publikacje dotyczące zanieczyszczenia ściółki, poza tym w dalszym ciągu badacze skupiają się na pomieszczeniach fermowych (Seedorf 2004, Witkowska i in. 2008, Szadkowska-Stańczyk i in. 2010, Buczyńska i Szadkowska-Stańczyk 2010, Roussel i in. 2011, Kiliszczuk i in. 2013, Ropek i Frączek 2016). Niestety, zupełnie pomijany jest aspekt oceny potencjalnego zagrożenia ze strony drobnoustrojów zasiedlających szeroko rozumiane środowisko ośrodków jazdy konnej (Witkowska i in. 2010). Powietrze znajdujące się w

stajniach, koński obornik a także same zwierzęta mogą być źródłem chorobotwórczych i lekoopornych mikroorganizmów. Dlatego prezentowane osiągnięcie naukowe, na które składają się obszerne, kilkuletnie i kompleksowe badania obejmujące analizę zagrożeń mikrobiologicznych, których źródłem mogą być ośrodki jazdy konnej ze szczególnym uwzględnieniem rozprzestrzeniania się lekoopornych bakterii, uzupełniają tę lukę. Równie ważnym aspektem prezentowanych badań jest fakt, iż materiał biologiczny, wykorzystany w analizach zaprezentowanych w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego był pobierany w trzech ośrodkach jazdy, z których dwa prowadzą boksowy system utrzymania koni a jeden wolnowybiegowy. Takie działanie miało na celu porównanie potencjalnych zagrożeń mikrobiologicznych pomiędzy ośrodkami jazdy różniącymi się systemem utrzymania koni i miało stać się punktem wyjścia dla zaplanowanych analiz, a w konsekwencji dostarczyć nowych i unikalnych wyników w zakresie mikrobiologii środowiskowej. Dodatkowo, poszerzenie badań o analizę bakteriobójczych właściwości nanocząstek srebra otrzymanych dwoma metodami, względem wybranych izolatów, pozwoliło na ocenę potencjału aplikacyjnego nanostruktur, jako składnika preparatów mogących służyć odkażaniu i dezynfekcji pomieszczeń użytkowanych przez konie. Opisywane badania nie były dotychczas prowadzone w tak dużej skali, a co za tym idzie przyczynią się do poszerzenia wiedzy i dostarczą wielu nowych informacji w tym obszarze.

Stajnie i inne budynki inwentarskie są nie tylko miejscem hodowli i przetrzymywania zwierząt, ale także środowiskiem pracy ludzi. Stan sanitarny powietrza w stajniach ma bezpośredni wpływ na zdrowie i samopoczucie osób pracujących z końmi oraz samych zwierząt. Przyczyną kumulowania się zanieczyszczeń jest częste w takich miejscach wysokie zapylenie, a także mały przepływ powietrza wewnątrz pomieszczeń, gdzie przetrzymuje się zwierzęta. Zanieczyszczenia powietrza w budynkach inwentarskich pochodzą głównie od zwierząt, ich odchodów, paszy oraz ściółki (Bombik i in. 2011). Drobnoustroje stanowiące bioaerozol pomieszczeń inwentarskich charakteryzuje warunkowa zjadliwość, jednak w stanach obniżonej odporności okresowo występującej u ludzi, bądź zwierząt, powietrze może być źródłem szczepów patogennych wywołujących zoonozy i epizootie. Należy podkreślić, że konie, ich miłośnicy oraz opiekunowie spędzają dużo czasu w stajni i mogą być narażeni na działanie szkodliwego bioaerozolu, co w konsekwencji może doprowadzić do powstania u nich chorób płuc (Chang i in. 2001).

Według Pesaro (1995), obornik pochodzący od zdrowych zwierząt zawiera naturalną mikroflorę jelitową, którą cechuje umiarkowana lub znikoma zjadliwość. W oborniku występować może każdy mikroorganizm, który został wydalony z organizmu zwierzęcia wraz

z fekaliami (Guan i Holley 2003). Jednak odchody osobników chorych lub bezobjawowych nosicieli, stanowią zagrożenie epidemiologiczne dla innych zwierząt oraz ludzi mających z nimi kontakt. Z uwagi na fakt, że odchody końskie stanowią źródło łatwo przyswajalnych składników odżywczych, są doskonałym nawozem naturalnym. Jednak wprowadzanie obornika do gleby wiąże się z problemami higieniczno-sanitarnymi oraz ekologicznymi. Istnieje możliwość pojawienia się w końskich odchodach drobnoustrojów patogennych, groźnych dla zdrowia zwierząt i ludzi, co może prowadzić do skażenia gleb i wody oraz infekcji roślin (Skowron i in. 2015). Mamy wtedy do czynienia ze skażeniem środowiska przez drobnoustroje chorobotwórcze, często o wysokiej lekooporności (Venglovsky i in. 2009).

Konie i środowisko ich bytowania jest rezerwuarem drobnoustrojów opornych na antybiotyki, co ma bezpośrednie przełożenie na ich zdrowotność, efektywność leczenia oraz bezpieczeństwo epidemiologiczne ludzi mających kontakt z tymi zwierzętami. Niezwykle istotnym zagadnieniem jest także transmisja odzwierzęcych, bakteryjnych czynników ryzyka, która stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego. W literaturze światowej istnieją doniesienia na temat rozprzestrzeniania się genów lekooporności u bakterii *Escherichia coli* i *Staphylococcus* spp. izolowanych od zwierząt w tym koni (Ahmed i in. 2010, Maddox i in. 2012). Niestety, mimo iż hodowla koni na ziemiach polskich posiada wielowiekową tradycję a jeździectwo staje się coraz bardziej popularne, w dalszym ciągu w Polsce niewiele jest badań na ten temat. Na terenie kraju znajduje się wiele klubów i ośrodków jazdy konnej a także gospodarstw agroturystycznych, w których można jeździć konno. Jazda konna w ostatnich latach stała się formą spędzania wolnego czasu, rekreacją a nawet rehabilitacją. Nie bez znaczenia dla rozwoju hodowli koni w Polsce jest także intensywny rozwój jeździectwa jako sportu kwalifikowanego. Osoby korzystające z tej formy spędzania wolnego czasu, poprzez bezpośredni kontakt ze zwierzętami w oczywisty sposób podlegają ekspozycji na zoonotyczne czynniki ryzyka, w tym lekooporne bakterie (Ahmed i in. 2010, Maddox i in. 2012). Należy także pamiętać o tym, że konie posiadają status zarówno zwierzęcia towarzyszącego jak i rzeźnego, a Polska znajduje się w czołówce krajów będących producentami koniny oraz eksporterami żywych koni rzeźnych, m.in. do Włoch, Francji i Belgii. Ryzyko związane z konsumpcją mięsa pochodzącego od koni, które mogły być leczone antybiotykami jest jak najbardziej realne, o czym świadczą doniesienia mówiące o pojawianiu się w pobieranych poubojowo próbkach końskiego mięsa pozostałości leków (Bryan i in. 2010, Wróblewski i Wojtaszek 2015).

Dynamiczny rozwój jeździectwa w Polsce wpłynął na podniesienie poziomu oferowanych przez tę branżę usług. Zaczęto zwracać szczególną uwagę na standardy higieniczne panujące w stajniach, ponieważ czystość w boksie konia jest niezwykle istotna z powodów zdrowotnych. Zachowanie czystości w stajni pozwala uchronić konie przed wieloma chorobami oddechowymi i grzybiczymi (Lloyd i in. 2007). Dlatego dokłada się wszelkich starań, aby poprzez prace porządkowe utrzymywać boksy i inne pomieszczenia w czystości. Coraz częściej oprócz tradycyjnych metod dezynfekcji boksów, żłobów i poideł z użyciem środków opartych na np. dichloroizocyjanuranie sodu (NaDCC), olejkach aromatycznych, mononadsiarczanie potasu i kwasach organicznych stosuje się także preparaty zawierające nanosrebro (AgNPs). Nanosrebro za względu na swoje bakteriobójcze właściwości jest także składnikiem maści stosowanych, np. w leczeniu grudy u koni oraz jest składnikiem szamponów, balsamów i innych środków czystości dla tych zwierząt. Oprócz codziennej wymiany ściółki zanieczyszczonej obornikiem należy cyklicznie dezynfekować boksy, żłoby i poidła. W tym celu stosuje się różnego rodzaju środki, które w swoim składzie mogą zawierać nanosrebro. Nanocząstki znajdują także zastosowanie w medycynie weterynaryjnej. Interesującą perspektywą jest wykorzystanie nanocząstek w walce z wysoce zjadliwymi i lekoopornymi patogenami zwierzęcymi, tj. *Brucella* spp., *Mycobacterium bovis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rhodococcus equi* (McMillan i in. 2011). Stąd opracowanie bezpiecznej dla środowiska metody otrzymywania nanosrebra zwiększyłoby jego produkcję oraz zastosowanie w tym obszarze.

Cel i zakres badań

Podstawowym celem badawczym była ocena występowania zagrożeń mikrobiologicznych w trzech ośrodkach jazdy konnej różniących się sposobem utrzymania koni (jeden ośrodek prowadzi bezstajenny system utrzymania koni, a dwa – różniące się wielkością ośrodki – posiadają stajnie boksowe). Cel ten zrealizowano poprzez analizę występowania i liczebności w powietrzu i oborniku wybranych grup drobnoustrojów, a także ocenę oporności na antybiotyki bakterii *E. coli* i *Staphylococcus* spp. wyizolowanych ze środowiska ośrodków jazdy konnej.

Określono liczbę bakterii tlenowych mezofilnych, grzybów pleśniowych, *Staphylococcus* spp., *E. coli* i *Salmonella* spp., bytujących w końskim oborniku, a także dokonano oceny jakości mikrobiologicznej powietrza pobranego z analizowanych ośrodków jazdy konnej pod względem występowania bakterii tlenowych mezofilnych, grzybów pleśniowych, promieniowców, *Staphylococcus* spp. i *E. coli*. Na tej podstawie określono, jak

system utrzymania koni wpływa na stężenie i skład bioaerozolu a także na zasiedlenie obornika przez wybrane grupy mikroorganizmów.

Przeprowadzono analizę profilu lekooporności i ocenę występowania genów odpowiedzialnych za produkcję beta-laktamaz o rozszerzonym spektrum działania (ESBL) u bakterii *E. coli* izolowanych z powietrza, obornika oraz nozdrzy koni. Przeprowadzono także ocenę podobieństwa genetycznego zgromadzonych szczepów. Dla bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, izolowanych z powietrza, obornika oraz nozdrzy koni, także wykonano analizę profilu lekooporności ze szczególnym uwzględnieniem metycylinooporności i warunkujących ją genów *mecA*. Uzyskane informacje pozwoliły na stwierdzenie, czy w środowisku ośrodków jazdy konnej różniących się systemem utrzymania koni znajdują się wielolekooporne szczepy *Staphylococcus* spp. i *E. coli*, które mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia publicznego.

Wykonano także badania wrażliwości zgromadzonych szczepów *E. coli* i *Staphylococcus* spp. na nanocząstki srebra otrzymane na drodze redukcji chemicznej oraz z udziałem biologicznych komponentów, celem stwierdzenia potencjału aplikacyjnego nanostruktur, jako składnika preparatów służących odkażaniu i dezynfekcji pomieszczeń użytkowanych przez konie.

Opis uzyskanych wyników

Prace **I.B.1.** i **I.B.2.** powstały w efekcie kilkuletnich badań przeprowadzonych w trzech ośrodkach jazdy konnej: Ośrodku Jazdy Konnej Pegaz w Krakowie, Klubie Jazdy Konnej Szary w Michałowicach i Stadninie Koni Huculskich w Nielepicach. Na podstawie wywiadu środowiskowego nie stwierdzono, aby konie biorące udział w doświadczeniu w omawianym okresie chorowały oraz były leczone farmakologicznie, co mogłoby mieć wpływ na wyniki prowadzonych analiz. OJK Pegaz jest przykładem niewielkiej stajni z 7 boksami zamkniętymi oraz 8 typu angielskiego. KJK Szary to jedna z większych i nowocześniejszych stajni w Polsce, posiadająca łącznie ok. 100 boksów typu zamkniętego. SKH Nielepice jako jedyna prowadzi bezstajenny chów zwierząt, posiada 30 koni.

W pracy **I.B.1.** w oparciu o trzyletnie badania dokonano oceny jakości mikrobiologicznej powietrza w trzech ośrodkach jazdy konnej różniących się sposobem utrzymania koni. Powietrze w wytypowanych w każdym ośrodku punktach pobierano przez trzy lata (2015 – 2017 r.), cztery razy w roku (wiosna, lato, jesień, zima) w celu uwzględnienia zjawiska sezonowości. Liczebność wybranych mikroorganizmów, tj. bakterie mezofilne tlenowe, grzyby pleśniowe, promieniowce, *Staphylococcus* spp. i *E. coli*, określano

metodą zderzeniową (MAS-100, Merck, Szwajcaria) przy użyciu odpowiednich podłoży mikrobiologicznych. Jednocześnie mierzono temperaturę powietrza i wilgotność względną (Kestrel 4000, Nielsen-Kellerman, USA) oraz stężenie pyłów zawieszonych: PM₁₀, PM_{2,5} (pyłomierz, DustTrak, TSI).

W powietrzu trzech ośrodków jazdy konnej stwierdzono występowanie typowych dla środowiska pomieszczeń inwentarskich bakterii z rodzajów *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Diplococcus* i *Sarcina*. Wśród grzybów zidentyfikowano rodzaje *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Trichothecium*, *Cladosporium* i *Alternaria*. Bakterie najliczniej w OJK Pegaz i KJK Szary występowały latem (2756 jtk·m⁻³, 2886 jtk·m⁻³), najmniej stwierdzono ich zimą (864 jtk·m⁻³, 1995 jtk·m⁻³). W obu stajniach w większości punktów pomiarowych powietrze oceniono jako średnio lub silnie zanieczyszczone tymi drobnoustrojami. Natomiast w SKH Nielepice powietrze zakwalifikowano jako niezanieczyszczone bakteriami, których najwyższą średnią liczebność stwierdzono na wiosnę (460 jtk·m⁻³) i w lecie (424 jtk·m⁻³). Stężenie grzybów w powietrzu we wszystkich ośrodkach jazdy konnej nie przekroczyło dopuszczalnego poziomu zanieczyszczenia. W OJK Pegaz ich średnia liczebność była najwyższa w lecie (1202 jtk·m⁻³) i jesieni (1000 jtk·m⁻³) a znacznie spadała zimą (233 jtk·m⁻³). Natomiast w KJK Szary średnia liczebność grzybów była największa jesienią (2443 jtk·m⁻³) a najmniejsza zimą (1271 jtk·m⁻³). W SKH Nielepice wiosna i lato były porami roku, w których średnia liczebność grzybów (992 jtk·m⁻³, 1140 jtk·m⁻³) była najwyższa. Zaobserwowano duże zróżnicowanie w liczebności promieniowców pomiędzy stanowiskami badawczymi, stąd powietrze kwalifikowano, jako czyste, średnio lub silnie zanieczyszczone tymi drobnoustrojami we wszystkich trzech ośrodkach. Najwyższe średnie liczebności promieniowców w OJK Pegaz stwierdzono wiosną (271 jtk·m⁻³), w KJK Szary i SHK Nielepice w lecie (1057 jtk·m⁻³, 120 jtk·m⁻³). W OJK Pegaz i KJK Szary gronkowce najliczniej występowały latem (1837 jtk·m⁻³, 2916 jtk·m⁻³), w SKH Nielepice wiosną (387 jtk·m⁻³). Natomiast, liczebność *Staphylococcus* spp. w SKH Nielepice była o rząd, bądź dwa wielkości mniejsza niż w OJK Pegaz i KJK Szary, co zapewne miało związek z faktem, iż w SKH Nielepice wszystkie stanowiska badawcze zlokalizowane zostały na wolnym powietrzu. Bakterie *E. coli* w niewielkiej liczebności wykryto OJK Pegaz i KJK Szary, natomiast nie stwierdzono ich w SKH Nielepice.

Na podstawie analizy średnich liczebności badanych grup drobnoustrojów w poszczególnych ośrodkach jazdy konnej na przestrzeni trzech lat badań można uznać, że

ogólna liczba wszystkich badanych mikroorganizmów była najwyższa w KJK Szary, potem kolejno w OJK Pegaz i SKH Nielepice.

Zapylenie obydwoma frakcjami pyłu (PM_{10} , $PM_{2,5}$), jak i wartości temperatury oraz wilgotności względnej były zdecydowanie wyższe w OJK Pegaz i KJK Szary niż SKH Nielepice. Przyczyn tego zjawiska oraz wysokich stężeń bioaerozolu w stajniach boksowych upatruje się w różnicach dotyczących systemu utrzymania koni. W ośrodkach, które prowadzą boksowy system utrzymania koni, zwierzęta dużo czasu spędzają w boksach. Wiele czynności pielęgnacyjnych i porządkowych wykonuje się na ograniczonej, zamkniętej przestrzeni. Ponadto, w boksach znajduje się obornik a w pomieszczeniach gospodarskich są pasza, siano i słoma dla koni, które stanowią źródło zapylenia powietrza. Należy jednak zaznaczyć, że najwyższe przekroczenia norm zapylenia powietrza we wszystkich trzech ośrodkach odnotowano zimą, co było także efektem ogólnie złego stanu powietrza w Małopolsce, w której od wielu lat trwa walka ze smogiem.

W pracy **I.B.2.** opisano badania prowadzone w tej samej przestrzeni czasowej co analizy przedstawione w publikacji **I.B.1.** W pracy **I.B.2.** zaprezentowano badania dotyczące właściwości mikrobiologicznych końskiego obornika w trzech ośrodkach jazdy konnej różniących się systemem utrzymania koni. Metodą seryjnych rozcieńczeń wg Kocha z zastosowaniem specjalistycznych podłoży mikrobiologicznych oznaczono liczebność wybranych grup mikroorganizmów, tj. bakterie tlenowe mezofilne, grzyby pleśniowe, *Staphylococcus* spp., *E. coli* i *Salmonella* spp.. Stwierdzono występowanie typowych dla środowiska pomieszczeń inwentarskich bakterii z rodzajów *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Micrococcus*, *Diplococcus*, *Sarcina* i *E. coli* oraz grzybów z rodzaju *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Trichothecium*, *Cladosporium* i *Alternaria*. Odczyn obornika stwierdzony w badaniach oscyłował w granicach pH obojętnego (OJK Pegaz 6,32–9,31; KJK Szary 6,40–8,81; SKH Nielepice 6,78–8,57), w niektórych przypadkach osiągając wartości lekko zasadowe lub lekko kwaśne, tym samym nie wpływając w sposób znaczący na wzrost mikroorganizmów. Liczebność drobnoustrojów izolowanych z końskiego obornika podlegała sezonowym zmianom (najwięcej mikroorganizmów w oborniku stwierdzono wiosną i latem, kiedy odnotowywano także wyższą temperaturę powietrza). Na podstawie przeprowadzonych badań dotyczących liczebności wybranych grup mikroorganizmów w poszczególnych ośrodkach jazdy konnej stwierdzono, że w oborniku pobranym w KJK Szary ogólna liczba badanych grup drobnoustrojów była najwyższa. Jak widać, pomimo zachowania wysokiego standardu higieny w obiekcie, tak duża obsada zwierząt oraz ilość przechowywanej ściółki i paszy jest

istotnym czynnikiem wpływającym na wzrost liczby drobnoustrojów w stajni. Natomiast wysoka liczebność bakterii mezofilnych i grzybów pleśniowych w oborniku pochodzącym z SKH Nielepice, wskazuje na fakt, że równie ważnym źródłem tych mikroorganizmów jest środowisko naturalne (powietrze i gleba).

Wspólnym punktem wyjścia dla badań opisanych w pracach **I.B.3.** i **I.B.4.** była izolacja szczepów *E. coli* i *Staphylococcus* spp. prowadzona w zależności od źródła: obornik – metodą seryjnych rozcieńczeń wg Kocha, powietrze – metodą uderzeniową z zastosowaniem impaktora typu MAS-100 (Merck, Szwajcaria), nozdrza koni – metodą wymazów, posiewając materiał biologiczny na wybiórcze, chromogenne podłoża mikrobiologiczne. Identyfikację gatunkową wykonano przy pomocy obserwacji mikroskopowych preparatów barwionych wg metody Grama a także techniki MALDI-TOF MS. W pracy **I.B.3.** opisano dwuletnie badania w efekcie których zgromadzono 200 szczepów *E. coli* (64 z OJK Pegaz, 103 z KJK Szary i 33 z SKH Nielepice, dominowały izolaty pochodzące z wymazów i obornika, najmniej licznie występowały szczepy z powietrza). Ocenę lekooporności, ze szczególnym uwzględnieniem wykrywania mechanizmu ESBL, przeprowadzono przy pomocy metody dyfuzyjno-krażkowej. W celu wykrycia genów warunkujących mechanizm ESBL (*blaTEM*, *blaSHV*, *blaOXA*, *blaCTXM-3*, *blaCTXM-9*) posłużono się techniką PCR, zaś różnicowanie genetyczne izolatów *E. coli* wykonano przy pomocy rep-PCR z zastosowaniem primera *BOXAIR*. Analizę przeprowadzono z udziałem 182 szczepów *E. coli* wyizolowanych w toku badań, dla których udało się uzyskać profile prążkowe oraz szczepu wzorcowego ATCC 25922. W pracy **I.B.4.** profil lekooporności zgromadzonych 408 szczepów gronkowców (120 z OJK Pegaz, 141 z KJK Szary i 147 z SKH Nielepice, dominowały izolaty pochodzące z wymazów, najmniej licznie występowały szczepy z powietrza) poszerzono o oznaczenie mechanizmu MLS_B konstytutywnego i indukcyjnego oraz MS_B . Technikę PCR zastosowano w celu wykrycia genów *mecA* warunkujących metycylinooporność.

W pracy **I.B.3.** najmniejszy udział wśród zgromadzonych szczepów *E. coli* stanowiły izolaty z SKH Nielepice (16,5%), w tym w żadnej z próbek powietrza tam pobranych nie stwierdzono występowania tych bakterii. Na podstawie zgromadzonych danych widać wyraźnie, że w ośrodkach utrzymujących boksowy chów koni (OJK Pegaz i KJK Szary), *E. coli* izolowana jest częściej, w tym także z powietrza. Ponadto, w OJK Pegaz (48,44%) i KJK Szary (45,63%) najliczniejszą część zgromadzonych szczepów stanowiły izolaty pochodzące z wymazów z nozdrzy koni, co świadczy o tym, że zwierzęta dużo czasu spędzają w swoich boksach, gdzie mają bezpośredni kontakt z własnymi odchodami. Najwyższą oporność izolatów *E. coli* stwierdzono na ampicylinę, aztreonam i tikarcylinę. Wśród zgromadzonych

bakterii najczęściej występowała oporność na 1 lub 2 antybiotyki jednocześnie, maksymalnie na 10. W OJK Pegaz i KJK Szary wykryto po 2 izolaty MDR (wielolekooporne, izolowane z powietrza i wymazów) oraz również w KJK Szary wykryto 1 izolat XDR (rozszerzona oporność, izolowany z wymazu). Fenotypowo mechanizm ESBL stwierdzono najczęściej w OJK Pegaz (20,31% izolatów) a także w KJK Szary (15,53% izolatów) i SKH Nielepice (15,15% izolatów). Spośród szukanych genów odpowiedzialnych za produkcję beta-laktamaz, *blaTEM* występował najczęściej w KJK Szary (53,40% izolatów), natomiast drugi wykryty gen *blaCTXM-9*, najczęściej występował w SKH Nielepice (6,06% izolatów), pozostałych genów nie stwierdzono. Gen *blaCTXM-9* we wszystkich przypadkach występował razem z genem *blaTEM*, nigdy pojedynczo. Na podstawie wyników uzyskanych z analizy rep-PCR skonstruowano dendrogramy UPGMA, w celu odpowiedzi na pytanie czy szczepy wyizolowane z różnych środowisk (tj. powietrza, obornika i wymazów) wewnątrz poszczególnych ośrodków jazdy konnej charakteryzują się genetycznym pokrewieństwem. Zarówno w oparciu o dendrogramy jak i analizę AMOVA wykazano, że szczepy środowiskowe pochodzące z badanych ośrodków jazdy konnej różnią się znacznie od szczepu wzorcowego, a także stwierdzono znaczne genetyczne zróżnicowanie pomiędzy izolatami, również tymi pochodzącymi z tego samego środowiska a nawet z wymazów od tego samego zwierzęcia. Z kolei na podstawie analizy haplotypów stwierdzono różnice w częstości ich występowania pomiędzy badanymi ośrodkami jazdy. Największą częstość haplotypów obserwowano w ośrodku posiadającym największą liczbę koni – KJK Szary. Również stadnina SKH Nielepice, gdzie prowadzi się wolnowybiegowy system utrzymania koni, charakteryzowała się wysoką częstością haplotypów. Dwukrotnie niższą częstość haplotypów obserwowano w OJK Pegaz, w którym jednocześnie stwierdzono największy udział szczepów ESBL.

W pracy **I.B.4.** nie stwierdzono zależności pomiędzy systemem utrzymania koni (boksowy, wolnowybiegowy) a częstością izolacji gronkowców. Natomiast widać wyraźnie, że w SKH Nielepice utrzymującej wolnowybiegowy chów koni, gronkowce w przeważającej większości izolowano z wymazów (84,35%), przy bardzo niewielkim odsetku szczepów pozyskanych z powietrza (8,16%) i obornika (7,48%). Ciągła ekspozycja obornika na niekorzystne warunki atmosferyczne oraz brak stajni boksowej spowodowany wolnowybiegowym chowem stosowanym w SKH Nielepice, są powodami, dla których liczebność gronkowców w powietrzu i oborniku była niska. Wśród wyizolowanych szczepów zidentyfikowano 21 gatunków, z czego najliczniej występowały: *S. vitulinus* (139), *S. xylosus* (70) i *S. equorum* (46). Przy czym o ile *S. vitulinus* najczęściej izolowany był w OJK Pegaz i

KJK Szary, to w SKH Nielepice występował w śladowej ilości. Najliczniej w SKH Nielepice stwierdzono występowanie *S. equorum*. Wszystkie izolaty poza *S. delphini* (11) – CPS (koagulazo-dodatni) oraz *S. aureus* (18) i *S. hyicus* (4) – CNS/CPS (koagulazo-ujemny/koagulazo-dodatni) należały do gronkowców koagulazo-ujemnych (CNS). Szczególny niepokój budzi obserwacja, że 17 izolatów *S. aureus* pochodzących z SKH Nielepice izolowane było z nozdrzy, co świadczy o kolonizacji koni tymi bakteriami. Wśród testowanych antybiotyków stwierdzono najwyższą oporność na gentamycynę i tetracyklinę. Najczęściej występowała oporność na 1,2 lub 3 antybiotyki jednocześnie, maksymalnie na 6. Wykryto także izolaty MDR, w KJK Szary (10, z czego 5 z wymazów, 3 z powietrza, 2 z obornika), w SKH Nielepice (5, z czego 4 z wymazów, 1 z obornika), w OJK Pegaz (4, z czego 2 z powietrza, 1 z wymazu, 1 z obornika). Metycylinooporność za pomocą testu dyfuzyjno-krażkowego stwierdzono u 23 szczepów, natomiast gen *mecA* wykryto u 142 izolatów. Na uwagę zasługuje fakt, iż 137 szczepów posiadających gen *mecA* to gronkowce koagulazo-ujemne, które jak pokazują badania własne mogą być rezerwuarem metycylinooporności. Najliczniej gen *mecA* występował u gronkowców izolowanych w KJK Szary (61,70%). Ponadto, gen *mecA* wykryto u 5 szczepów, które należały do gatunku *S. aureus* i pochodziły z wymazów wyizolowanych od koni w SKH Nielepice, co wskazuje na obecność u tych zwierząt szczepów MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*). Wśród badanych izolatów stwierdzono występowanie szczepów posiadających mechanizm oporności typu MLS_B indukcyjny (6 szczepów) i MS_B (3 szczepy). Obecność fenotypu MLS_B indukcyjnego oznacza, że izolaty te są odporne na erytromycynę i wrażliwe na klindamycynę i w przypadku zakażenia wywołanego takim szczepem nie powinno się stosować linkosamidów, makrolidów i streptogramin B. Wykryto także fenotyp MS_B i w tym przypadku nie należy stosować makrolidów 14- i 15-członowych oraz streptogramin B.

W pracach **I.B.5.**, **I.B.6.** i **I.B.7.** wykorzystano 65 izolatów *E. coli* pozyskanych z końskiego obornika i 122 izolaty *Staphylococcus* spp. (6 dominujących gatunków), pochodzące z powietrza pobieranego w KJK Szary w Michałowicach. Szczepy zostały wyizolowane i zidentyfikowane analogicznie, jak to miało miejsce we wcześniejszych analizach opisanych w publikacjach **I.B.3** i **I.B.4**. W publikacjach **I.B.5.**, **I.B.6.** dokonano oceny bakteriobójczych właściwości nanosrebra względem izolatów *E. coli* i *Staphylococcus* spp.. Testowane zawiesiny nanosrebra otrzymano na drodze redukcji chemicznej polegającej na redukcji soli będącej źródłem jonów metalu przez czynnik redukujący w obecności odpowiedniego stabilizatora chroniącego nanocząstki przed łączeniem się w większe agregaty. W pracach **I.B.5.** oraz **I.B.6.** czynnikiem redukującym był powszechnie

stosowany borowodorek sodu, natomiast poliwinylpirolidon o masie cząsteczkowej 8000 stabilizował otrzymane nanostruktury (metoda chemiczna). W pracy **I.B.7.** testowane nanosrebro uzyskano z udziałem kwasu askorbinowego, jako reduktora, będącego komponentem naturalnie występującym w surowcach roślinnych, natomiast substancją stabilizującą była guma arabska – substancja również pochodzenia roślinnego (metoda proekologiczna). Wrażliwość bakterii na nanosrebro oceniono przy pomocy metody dyfuzyjno-krażkowej z zastosowaniem ampicyliny (*E. coli*) i cefoksytyny (*Staphylococcus* spp.) jako kontroli pozytywnej.

Nanocząstki srebra otrzymane metodą chemiczną opisaną w publikacjach **I.B.5.**, **I.B.6.** charakteryzowały się silną absorpcją optyczną promieniowania UV-Vis o długości fali około 400 nm, świadcząca o obecności nanocząstek w zawiesinie. Dodatkowo udowodniono, iż uzyskane nanocząstki cechuje wysoka stabilność w czasie oraz w szerokim zakresie pH, mimo starzenia i długiego przechowywania, co rozszerza możliwości aplikacyjne otrzymanych nanostruktur jako składników innowacyjnych dezynfektantów na bazie nanosrebra. Średni rozmiar cząstek w zawiesinie, określony przy użyciu nowoczesnej technologii nieinwazyjnego pomiaru intensywności światła rozproszonego (NIBS, ang. Non-Invasive Back Scatter), wskazuje na uzyskanie nanocząstek o średnim rozmiarze poniżej 100 nm czyli mieszczących się w umownej skali nanometrycznej. Około 67% ogółu nanocząstek cechuje się średnim rozmiarem 43,52 nm. Ostateczne potwierdzenie obecności nanocząstek srebra oraz obserwację morfologii nanostruktur umożliwiło zastosowanie skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) z detektorem BSE – otrzymano nanocząstki o kształcie zbliżonym do kulistego. Ponadto, punktowa analiza obrazów mikroskopowych przy wykorzystaniu mikroanalizatora rentgenowskiego dyspersji energii sprzężonego z mikroskopem skaningowym (SEM-EDS) potwierdziła obecność srebra w badanych zawiesinach.

Na podstawie uzyskanych wyników w pracach **I.B.5.**, **I.B.6.** i **I.B.7.** należy stwierdzić, że zarówno nanosrebro otrzymane na drodze redukcji chemicznej, jak i z udziałem kwasu askorbinowego, posiada silne antybakteryjne właściwości, które rosną wraz z jego stężeniem. W pracy **I.B.5.** minimalnym stężeniem nanosrebra hamującym wzrost (MIC) izolatów *E. coli* było 15 µg/ml. Niższe stężenia (5 i 10 µg/ml) nie hamowały wzrostu wszystkich szczepów. W przypadku 22 szczepów wykryto oporność na ampicylinę – jest to istotne, ponieważ mimo oporności na ten antybiotyk te same izolaty *E. coli* były wrażliwe na nanosrebro, w tym dla 18 szczepów stwierdzono MIC równe 5 µg/ml.

W pracy **I.B.6.** minimalnym stężeniem nanosrebra hamującym wzrost badanych izolatów *Staphylococcus* spp. było 30 µg/ml. Niższe stężenia (5, 10 i 15 µg/ml) nie hamowały wzrostu wszystkich szczepów. Biorąc pod uwagę wrażliwość na AgNPs izolatów reprezentujących poszczególne gatunki wyznaczono dla nich zbiorcze MIC. Jako MIC dla gatunku potraktowano takie stężenie nanosrebra, na które wszystkie izolaty do niego należące były wrażliwe, stąd minimalne stężenie hamujące wzrost gronkowców wynosiło kolejno: *S. sciuri* (10 µg/ml), *S. aureus*, *S. warneri*, *S. vitulinus* (15 µg/ml), *S. delphini*, *S. xylosus* (30 µg/ml). Analiza otrzymanych wyników nie pozwoliła na stwierdzenie zależności pomiędzy wrażliwością na nanosrebro i cefoksytynę. Było to związane z faktem, że niektóre izolaty odporne na niższe stężenia nanocząstek (5, 10, 15 µg/ml) a wrażliwe dopiero na 30 µg/ml nanosrebra cechowały się dużą wrażliwością na cefoksytynę (strefa zahamowania wzrostu >35mm). Natomiast, wśród izolatów wrażliwych już na 5 µg/ml nanosrebra były szczepy odporne na ten antybiotyk.

Ocenę właściwości bakteriobójczych nanocząsteczek srebra uzyskanych metodą proekologiczną opisaną w publikacji **I.B.7.** poprzedziła analiza fizykochemiczna otrzymanych nanostruktur. Tak, jak miało to miejsce w przypadku nanocząstek srebra otrzymanych metodą chemiczną, obecność nanocząstek w zawiesinie potwierdzono spektroskopowo – zaobserwowano charakterystyczny pik z maksimum absorpcji mieszczącym się w zakresie od 418 do 425 nm. Niewielkie przesunięcie λ_{\max} w kierunku dłuższych fal było spowodowane nieznacznym wzrostem wielkości cząstek w zawiesinie w miarę starzenia się zawiesiny. Pomiar średniej wielkości nanocząstek i ich rozkładu wielkości potwierdził powyższe założenia, gdyż średni rozmiar cząstek wzrósł z 70,7 nm w przypadku analizy jednodniowej zawiesiny, do 88,1 nm w przypadku analizy po sześciu miesiącach od przeprowadzenia procesu otrzymywania. Obserwacja morfologii nanocząstek z zastosowaniem techniki SEM wykazała sferyczny charakter tworzonych nanocząstek, bez tendencji do aglomeracji i tworzenia skupisk wykraczających poza skalę nanometryczną. Brak nadmiernej aglomeracji nanocząstek a także stabilność podczas przechowywania, potwierdza właściwy dobór substratów, co oznacza, iż możliwe jest otrzymanie stabilnych nanocząstek przy zastosowaniu substratów pochodzenia naturalnego, bez konieczności stosowania odczynników chemicznych, niejednokrotnie działających szkodliwie na organizmy żywe.

W pracy **I.B.7.** minimalnym stężeniem nanosrebra hamującym wzrost wszystkich izolatów *E. coli* było 400 µg/ml. Niższe stężenia (370 µg/ml) nie hamowały wzrostu wszystkich szczepów, bądź żadnego (350 µg/ml). Podobnie, jak to miało miejsce w pracy **I.B.5.** w przypadku 22 szczepów opornych na ampicylinę stwierdzono, że te same izolaty *E.*

coli były wrażliwe na nanosrebro, w tym dla 19 szczepów stwierdzono MIC równe 370 µg/ml.

Minimalnym stężeniem nanosrebra hamującym wzrost wszystkich badanych izolatów *Staphylococcus* spp. było 430 µg/ml. Niższe stężenia (400 µg/ml) nie hamowały wzrostu wszystkich szczepów, bądź żadnego (350 i 370 µg/ml). Biorąc pod uwagę wrażliwość na nanosrebro gronkowców reprezentujących poszczególne gatunki wyznaczono dla nich zbiorcze MIC. Jako MIC dla gatunku potraktowano takie stężenie nanosrebra, na które wszystkie izolaty do niego należące są wrażliwe, stąd minimalne stężenie hamujące wzrost gronkowców wynosiło kolejno: *S. aureus*, *S. delphini*, *S. warneri* (430 µg/ml) i *S. sciuri*, *S. xylosus*, *S. vitulinus* (400 µg/ml). Analiza otrzymanych wyników nie pozwoliła na stwierdzenie zależności pomiędzy wrażliwością na nanosrebro i cefoksytynę.

Analizując w publikacjach **I.B.5.**, **I.B.6.** i **I.B.7.** rozkład wrażliwości poszczególnych izolatów należących do gatunków *E. coli*, *S. xylosus*, *S. warneri*, *S. sciuri*, *S. delphini*, *S. vitulinus* i *S. aureus* na zastosowane nanosrebro (otrzymane dwoma metodami) wykazano, iż szczepy izolowane z powietrza oraz obornika znajdującego się w stajni, a należące do tego samego gatunku odznaczają się zróżnicowaną opornością na poszczególne stężenia nanocząstek i posiadają różne MIC. Zróżnicowanie stref zahamowania wzrostu bakterii z rodzaju *Staphylococcus* i gatunku *E. coli* wskazywało, iż oporność na poszczególne stężenia była cechą szczepową i nie miała związku z przynależnością do konkretnego gatunku ani nie była związana z miejscem izolacji (konkretnym boksem). Wykazano także, że zarówno w przypadku nanosrebra otrzymanego na drodze redukcji chemicznej, jak i przy użyciu metody proekologicznej, Gram-dodatnie gronkowce były mniej wrażliwe na bakteriobójcze działanie nanocząstek a minimalne stężenie hamujące ich wzrost było większe.

Porównano wyniki wrażliwości szczepów *Staphylococcus* spp. i *E. coli* na nanosrebro, otrzymane metodą chemiczną (**I.B.5.**, **I.B.6.**) i proekologiczną (**I.B.7.**). Testowane bakterie odznaczały się dużo większą wrażliwością na nanosrebro uzyskane z zastosowaniem metody chemicznej. Ponadto, pozyskiwane na drodze redukcji chemicznej AgNPs, oprócz innej metody otrzymywania, cechowało się także mniejszymi rozmiarami niż nanocząstki srebra otrzymane z użyciem kwasu askorbinowego. Tym samym należy uznać, że nanosrebro pozyskane na drodze redukcji chemicznej z zastosowaniem silnego, toksycznego reduktora borowodorku sodu, posiada silniejsze bakteriobójcze właściwości zarówno względem bakterii Gram-dodatnich (*Staphylococcus* spp.) jak i Gram-ujemnych (*E. coli*), niż AgNPs otrzymane z udziałem witaminy C jako substancji redukującej oraz gumy arabskiej jako stabilizatora. Natomiast proponowana w pracy **I.B.7.** proekologiczna metoda pozyskiwania nanosrebra z

użyciem nietoksycznych komponentów powszechnie występujących w świecie roślinnym, stwarza nowe i szerokie możliwości aplikacyjne np. jako środki dezynfekujące bezpieczne dla środowiska i organizmów wyższych, które mogłyby być w przyszłości zastosowane do odkażania pomieszczeń użytkowanych przez konie.

Najważniejsze wnioski wynikające z przeprowadzonych badań wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

1. Mikroorganizmy bytujące w ośrodkach jazdy konnej stanowią zagrożenie zdrowotno-higieniczne zarówno dla znajdujących się tam koni, jak i ludzi mających kontakt z tymi zwierzętami. Jak pokazują wyniki badań własnych, konie oraz środowisko ich bytowania stanowią zarówno rezerwuar potencjalnie chorobotwórczych drobnoustrojów opornych na antybiotyki, ale także są źródłem chociażby toksynotwórczych grzybów, mogących niekorzystanie oddziaływać na zdrowie ludzi i zwierząt. Ponadto stwierdzone wysokie zapylenie utrzymujące się w stajniach boksowych może prowadzić do zwiększonej zapadalności na choroby układu oddechowego i tym samym także stanowi zagrożenie zarówno dla koni jak i ich opiekunów.

2. System utrzymania koni wpływa na liczebność i występowanie w bioaerozolu badanych drobnoustrojów. W ośrodkach jazdy konnej prowadzących boksowy system utrzymania (OJK Pegaz, KJK Szary) występuje wyższe zanieczyszczenie powietrza mikroorganizmami. Ponadto, w tych ośrodkach w skali trzyletnich pomiarów odnotowano także, wyższą temperaturę i wilgotność względną oraz większe zapylenie powietrza, które notorycznie przekraczało wartości graniczne. Stężenie bioaerozolu zależało od temperatury i wilgotności powietrza oraz podlegało sezonowym wahaniom. Wysoka zawartość pyłów zawieszonych (PM₁₀ i PM_{2,5}) występująca zwłaszcza w ośrodkach prowadzących boksowy system utrzymania koni, także była powodem wzrostu zanieczyszczenia mikrobiologicznego powietrza. Powietrze pobrane z największego ośrodka jeździeckiego (KJK Szary), posiadającego największą liczbę koni i boksowy system utrzymania, było najliczniej zasiedlone przez drobnoustroje.

3. Liczebność drobnoustrojów izolowanych z końskiego obornika podlegała sezonowym zmianom (wiosną i latem analizowanych mikroorganizmów było najwięcej). Badany materiał był licznie zasiedlony przez bakterie potencjalnie chorobotwórcze, tj. *E. coli* i *Staphylococcus* spp., a także grzyby toksynotwórcze. Stwierdzono, że wielkość obsady zwierząt w obiekcie, a

co za tym idzie ilość przechowywanej tam słomy i paszy dla zwierząt ma wpływ na liczebność badanych mikroorganizmów. W największym ośrodku jazdy konnej (KJK Szary) utrzymującym system boksowy, liczebność wszystkich analizowanych w oborniku grup drobnoustrojów była największa.

4. W stajniach prowadzących boksowy system utrzymania koni zalecana jest codzienna wymiana ściółki, aby obornik mogący być źródłem patogennych drobnoustrojów w nich nie zalegał. Niezwykle istotne jest także przechowywanie słomy oraz siana w odpowiednich warunkach (dobrze wentylowanych, suchych pomieszczeniach), aby uniemożliwić rozwój grzybów pleśniowych na tym materiale. Kolejną ważną rekomendacją wynikającą z przeprowadzonych badań jest zalecenie niewykonywania w stajni boksowej zabiegów pielęgnacyjnych u koni, mogących powodować wzrost zapylenia powietrza, a polegających na stryżeniu i czesaniu zwierząt. Takie czynności najlepiej wykonywać na wolnym powietrzu, a jeśli warunki atmosferyczne na to nie pozwalają, powinno być do tego przeznaczone osobne pomieszczenie. Takie postępowanie jest jednym z elementów dbania o dobrostan zwierząt a także przekłada się na warunki sanitarno-higieniczne panujące w stajniach.

5. W ośrodkach jazdy konnej występują w dużej liczebności wielolekooporne szczepy *E. coli* (oporne maksymalnie na 10 antybiotyków jednocześnie), które mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia publicznego oraz dla przebywających tam zwierząt. Mimo iż nie stwierdzono zależności pomiędzy zastosowanym systemem utrzymania koni a opornością na poszczególne antybiotyki, to faktem jest, że w stajniach boksowych *E. coli* izolowana jest częściej, w tym także z powietrza. Jak pokazują badania własne, konie spędzając dużo czasu w boksach, są narażone na kontakt ze swoimi odchodami, co przekłada się na liczną izolację tych bakterii z wymazów z nozdrzy. Ponadto, w populacji zgromadzonych izolatów wykryto występowanie fenotypu MDR i XDR, co jest szczególnie niepokojące, natomiast stanowi ważną informację, że w środowisku ośrodków jazdy konnej prowadzących boksowy system utrzymania są obecne szczepy o podwyższonej oporności na antybiotyki, tym samym stanowiąc poważne zagrożenie zdrowotne. Mechanizm ESBL stwierdzono na zbliżonym poziomie we wszystkich ośrodkach jazdy konnej. Spośród szukanych genów odpowiedzialnych za produkcję beta-laktamaz, wykryto *blaTEM* i *blaCTXM-9*. Badania różnicowania genetycznego wykazały, iż wyizolowane szczepy środowiskowe *E. coli* charakteryzują się ogromną różnorodnością. Jednak stopień różnicowania genetycznego tych bakterii był odmienny w poszczególnych ośrodkach jazdy konnej, a uzyskane wyniki wskazują na to, że w największej stajni (KJK

Szary), posiadającej największą liczbę koni, bioróżnorodność genetyczna bakterii *E. coli* była największa.

6. Populacja gronkowców zasiedlających środowisko ośrodków jazdy konnej jest bardzo zróżnicowana, natomiast gatunkiem dominującym w kolekcji zgromadzonych izolatów był *S. vitulinus*. Stwierdzono duże zróżnicowanie w częstotliwości występowania poszczególnych gatunków pomiędzy analizowanymi ośrodkami. Na podstawie zgromadzonych danych nie stwierdzono zależności pomiędzy systemem utrzymania koni a częstością izolacji *Staphylococcus* spp., natomiast najliczniejszą grupę gronkowców stanowiły szczepy izolowane z wymazów z końskich nozdrzy. Stwierdzono, że w ośrodkach jazdy konnej występują w dużej liczebności wielolekooporne szczepy *Staphylococcus* spp. (oporne maksymalnie na 6 antybiotyków jednocześnie), które mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia ludzi oraz przebywających tam zwierząt. We wszystkich trzech ośrodkach jazdy konnej dominowała oporność na gentamycynę i tetracyklinę. Ponadto w populacji zgromadzonych izolatów wykryto występowanie fenotypu MDR (we wszystkich trzech ośrodkach). Wśród badanych izolatów stwierdzono występowanie szczepów posiadających mechanizm oporności typu MLS_B indukcyjny i MS_B , które wykluczają w przypadku zakażenia możliwość podania linkosamidów, makrolidów i streptogramin B oraz makrolidów 14- i 15-członowych. Metacylinooporność za pomocą testu dyfuzyjno-krażkowego stwierdzono u 6-krotnie mniejszej liczby gronkowców, niż to miało miejsce w przypadku wykrywania genu *mecA* techniką PCR, co pokazuje, że metody fenotypowe mogą generować fałszywie ujemne wyniki. Rezerwuarem genu *mecA* były w znaczącej większości gronkowce koagulazoujemne. Natomiast gen *mecA* wykryto też u 5 szczepów, należących do gatunku *S. aureus*, które pochodziły z wymazów z końskich nozdrzy, co wskazuje na obecność u tych zwierząt szczepów MRSA.

7. Biorąc pod uwagę, że analizowane szczepy *E. coli* i *Staphylococcus* spp. pochodzą od niehospitalizowanych i nieleczonych farmakologicznie koni, możemy przyjąć, że zaobserwowana oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe jest zarówno pochodzenia naturalnego, tj. nie jest wynikiem presji selekcyjnej, jak i może być to oporność nabyta, ponieważ jej źródłem mogą być ludzie obecni w pomieszczeniach inwentarskich, pozostałe konie (nie biorące udziału w badaniu), a także powietrze, woda, gleba, pasza i ściółka. Natomiast można wyciągnąć wniosek, że badane konie są jednym ze źródeł występującej u *E. coli* i *Staphylococcus* spp. oporności na antybiotyki, dlatego uzasadnione jest dalsze monitorowanie jej zmian i rozprzestrzeniania się.

8. Biorąc pod uwagę rozbieżności pomiędzy wynikami analiz fenotypowych dotyczących oporności na antybiotyki (metoda dyfuzyjno-krażkowa) a testami genetycznymi, zasadnym jest prowadzenie dalszych badań mających na celu identyfikację czynników ryzyka rozprzestrzeniania się lekooporności wśród koni oraz optymalizację metod jej wykrywania. Jest to szczególnie istotne, ponieważ konie stanowią jeden ze składników zoonotycznej transmisji opornych na antybiotyki bakterii oraz mogą być zarówno biorcami, jak i rezerwuarem genów tej oporności, co stanowi duże zagrożenie epidemiologiczne.

9. Bakterie *E. coli* wyizolowane z końskiego obornika oraz *Staphylococcus* spp. wyizolowane z powietrza stajni były wrażliwe na testowane nanocząstki srebra otrzymane na drodze redukcji chemicznej. Minimalne stężenie hamujące wzrost (MIC) badanych izolatów było wyższe w przypadku Gram-dodatnich gronkowców. Natomiast poziom oporności na nanocząstki srebra prezentowany przez poszczególne szczepy Gram-ujemne i Gram-dodatnie był bardzo zróżnicowany. Na tej podstawie stwierdzono, że oporność na poszczególne stężenia nanosrebra jest cechą szczepową i nie ma związku z przynależnością do konkretnego gatunku. Ponadto biorąc pod uwagę fakt, że większość badań dotyczących toksyczności nanosrebra dotyczy gatunku *S. aureus*, jako modelowego przedstawiciela bakterii Gram-dodatnich, uzyskane w niniejszej pracy nowatorskie wyniki pokazują jednoznacznie, że także w zwalczaniu innych gatunków z rodzaju *Staphylococcus* AgNPs mogą być efektywnie stosowane.

10. Nanocząstki srebra otrzymane z udziałem komponentów naturalnie występujących w organizmach roślinnych, tj. kwas askorbinowy, działały bakteriobójczo na szczepy bakterii Gram-ujemnych (*E. coli*) i Gram-dodatnich (*Staphylococcus* spp.) izolowanych z obornika i powietrza stajni. Podobnie jak w przypadku nanosrebra otrzymanego na drodze redukcji chemicznej, gronkowce były mniej wrażliwe na bakteriobójcze działanie nanocząstek otrzymanych metodą proekologiczną, a minimalne stężenie hamujące ich wzrost było większe. Również wrażliwość poszczególnych izolatów należących do różnych gatunków na zastosowane nanosrebro była bardzo zróżnicowana i charakterystyczna dla danego szczepu. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że nanosrebro otrzymane na drodze redukcji chemicznej odznacza się większą toksycznością względem testowanych izolatów (niższe stężenia są bójcze). Natomiast ze względu na fakt, że bakteriobójcze nanosrebro otrzymano także z udziałem kwasu askorbinowego, wg nowatorskiej, nietoksycznej metody, uznano, że to właśnie ono mogłoby w przyszłości stanowić składnik preparatów służących do odkażania i dezynfekcji pomieszczeń użytkowanych przez konie.

Literatura:

1. Ahmed MO, Clegg PD, Williams NJ, Baptiste KE, Bennett M. 2010. Antimicrobial resistance in equine faecal *Escherichia coli* isolates from North West England. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 7(9):12.
2. Bryan J, Leonard N, Fanning S, Katz L, Duggan V. 2010. Antimicrobial resistance in commensal faecal *Escherichia coli* of hospitalised horses. *Ir Vet J* 63(6):373-379.
3. Buczyńska A., Szadkowska-Stańczyk I. 2010. Problemy higieny pracy i zagrożenia zdrowotne towarzyszące intensywnej produkcji trzody chlewnej. *Medycyna Pracy*. Vol. 61 Iss 3 s. 323-331.
4. Kiliszczuk A., Podlaska B., Sadowiec K., Zielinska-Polit B., Rytel M., Russel S. 2013. Ocena występowania grzybów oraz amoniaku i metanu w powietrzu w wybranym budynku inwentarskim. *Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie*. Vol. 13 Iss. 3(43) s. 79-89.
5. Lloyd D.H., Littlewood J.D., Craig J.M. Thomsett L.R. *Praktyczna dermatologia koni SIMA*, 114-117, Warszawa 2007.
6. Maddox TW, Clegg PD, Diggle PJ, Wedley AL, Dawson S, Pinchbeck GL, et al. 2012. Cross-sectional study of antimicrobial-resistant bacteria in horses. Part 1: Prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Equine Vet J* 44(3):289-96.
7. McMillan J, Batrakova E, Gendelman HE. 2011. Cell delivery of therapeutic nanoparticle. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 104:563-601. DOI: 10.1016/B978-0-12-416020-0.00014-0
8. Ropek D., Frączek K. 2016. Mikrobiologiczna jakość powietrza w obiektach inwentarskich gospodarstw rolnych. *Medycyna Środowiskowa-Environmental Medicine*. Vol. 19 Iss. 3 s. 16-22. DOI: 10.19243/2016302.
9. Roussel S., Sudre B., Reboux G., Waser M., Buchele G., Vacheyrou M., Dalphin J.C., Millon L., Braun-Fahrlander C., von Mutius E., Piarroux R. 2011. Exposure to moulds and actinomycetes in Alpine farms: A nested environmental study of the PASTURE cohort. *Environmental Research*. Vol. 111 s. 744-750. DOI: 10.1016/j.envres.2011.05.002.
10. Seedorf J. 2004. An emission inventory of livestock-related bioaerosols for Lower Saxony, Germany. *Atmospheric Environment*. Vol. 38 s. 6565-6581.
11. Szadkowska-Stańczyk I., Bródka K., Buczyńska A. 2010. Ocena narażenia na bioaerozole pracowników zatrudnionych przy intensywnej hodowli trzody chlewnej. *Medycyna Pracy*. Vol. 61. Iss. 3 s. 257-269.
12. Venglovsky J, Sasakova N, Placha I. 2009. Pathogens and antibiotic residues in animal manures and hygienic and ecological risks related to subsequent land application. *Bioresour Technol* 100:5386-5391.
13. Witkowska D., Chorąży Ł., Mituniewicz T., Makowski W. 2010. Zanieczyszczenia mikrobiologiczne ściółki i powietrza podczas odchowu kurcząt brojlerów. *Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie*. Vol.10 Iss. 2(30) s. 201-210.
14. Witkowska D., Chorąży Ł., Sowińska J., Iwańczuk-Czernik K., Wójcik A., Mituniewicz T. 2008. Mikrobiologiczne zanieczyszczenia powietrza w oborze krów mlecznych przy zastosowaniu różnych rodzajów wymiany powietrza. *Ekologia i Technika*. Vol. 16 Iss. 5A s. 186-189.
15. Wróblewski Z, Wojtaszek A. 2015. Principles of good veterinary practice in horses therapy. *Życie Weterynaryjne* 90(5):298-301.
16. Bombik, E., Bombik, T., Frankowska, A. (2011). Evaluation of selected parameters of horse stabling environment in box-stall stables. *Acta Scientiarum Polonorum Zootechnica*, 10(4), 13–22.
17. Chang, C. W., Chung, H., Huang, C. F., Su, H. J. J. (2001). Exposure of workers to air borne microorganisms in open-air swine houses. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 155–161.
18. Skowron K., Bauza-Kaszewska J., Kaczmerek A., Budzyńska A., Gospodarek E. 2015. Mikrobiologiczne aspekty gospodarki gnojowicą. *Postępy Mikrobiologii*. T. 54. Z. 3 s. 235–249.
19. Guan T.Y., Holley R.A. 2003. Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness – a review. *Journal of Environmental Quality*, 32: 383–392.
20. Pesaro F., Sorg I., Metzler A. 1995. In situ inactivation of animal viruses and a coliphage in nonaerated liquide and semiliquide animal wastes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 92–97.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

5.1. Przed uzyskaniem stopnia doktora (2009-2013)

Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora, główna część mojej działalności naukowej związana była z realizacją tematu pracy doktorskiej dotyczącego występowania, bioróżnorodności i znaczenia grzybów pleśniowych z rodzaju *Fusarium* izolowanych ze zbóż na terenie Małopolski. Analizy prowadzone podczas studiów doktoranckich obejmowały identyfikację gatunkową zgromadzonych szczepów, ocenę ich wrażliwości na wybrane fungicydy, nanostruktury i antymikotyki a także polegały na określeniu potencjału toksynotwórczego *Fusarium* spp. zarówno techniką PCR jak i z użyciem fitotestów. Badania w aspekcie oceny grzybobójczych właściwości fungicydów były prowadzone we współpracy

z przedsiębiorstwami produkującymi środki ochrony roślin (**III.Q.4.A.**). Uzyskane w toku badań wyniki, opublikowałam już po obronie pracy doktorskiej – w czasopismach z listy A (**II.A.4.**, **II.A.5.**) i B (**II.D.8.**, **II.D.9.**, **II.D.10.**, **II.D.13.**) oraz jako rozdział w polskojęzycznej monografii (**II.D.2.**). Ponadto efektem mojej pracy badawczej w tym zakresie było aktywne uczestnictwo w konferencjach zarówno krajowych jak i międzynarodowych, gdzie uzyskane wyniki prezentowałam w formie referatu (**II.K.4.**), a także doniesień (**III.B.1.**, **III.B.6.**, **III.B.11.B.**, **III.B.13.C.**), prace te dotyczyły wpływu ksenobiotyków oraz nanocząstek metali na grzyby z rodzaju *Fusarium*. Badania obejmujące analizę grzybobójczych właściwości nanosrebra względem *Fusarium* spp. zostały zrealizowane dzięki nawiązaniu współpracy z Katedrą Technologii Nieorganicznej i Biotechnologii Środowiska Instytutu Chemii i Technologii Nieorganicznej Politechniki Krakowskiej (**III.Q.3.A.**). Badania te zostały częściowo sfinansowane z funduszy na działalność statutową Katedry Mikrobiologii UR Kraków, a częściowo dzięki uzyskanej przeze mnie Wydziałowej Dotacji Celowej dla Młodych Naukowców (**III.Q.2.A.**). W tym czasie aktywnie uczestniczyłam także w wielu innych konferencjach, gdzie wygłaszałam referaty (**II.K.1.**, **II.K.2.**) oraz prezentowałam doniesienia (**III.B.2.**, **III.B.3.**, **III.B.4.**, **III.B.5.**, **III.B.7.**, **III.B.8.**, **III.B.9.A.**, **III.B.9.B.**, **III.B.9.C.**, **III.B.10.**, **III.B.11.A.**, **III.B.11.C.**, **III.B.12.**, **III.B.13.A.**, **III.B.13.B.**, **III.B.13.D.**, **III.B.13.E.**, **III.B.13.F.**), dotyczące szeroko rozumianej mikrobiologii środowiskowej. Ponadto napisałam sześć publikacji z których jedna (**II.D.1.**) powstała we współpracy z Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek w Krakowie (**III.Q.4.C.**) i dotyczyła charakterystyki szczepów bakterii *Streptococcus agalactiae*, ich izolacji, identyfikacji oraz oceny lekooporności. Dwie kolejne prace były rozwinięciem moich zainteresowań realizowanych w pracy doktorskiej i dotyczyły wpływu nanostruktur na bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (**II.D.3.**) – rozdział w anglojęzycznej monografii – oraz oceny porażenia zbóż w Małopolsce przez grzyby (**II.D.4.**). Opublikowałam także wyniki prowadzonych równolegle badań dotyczących występowania aerozolu mikrobiologicznego w wybranych pomieszczeniach Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie (**II.D.5.**) a także charakterystyki szczepów *Staphylococcus* spp. izolowanych od psów (**II.D.6.**). W tym czasie nawiązałam współpracę z Wydziałem Inżynierii Produkcji i Energetyki UR Kraków (**III.Q.3.B.**), której efektem była publikacja opisująca bioróżnorodność mikroorganizmów izolowanych z substratów stosowanych w biogazowniach rolniczych (**II.D.7.**). Kolejnym przykładem świadczącym o łatwości w nawiązywaniu współpracy zarówno z jednostkami naukowymi jak i przedsiębiorstwami jest moja kooperacja z zakładem ArcelorMittal Poland w Krakowie i Dąbrowie Górniczej (**III.Q.4.B.**). Uzyskane w efekcie tych działań wyniki,

opisujące bioróżnorodność mikroorganizmów zasiedlających gleby przemysłowe, zostały opublikowane w czasopiśmie z listy A (**II.A.1.**) oraz udostępnione kierownictwu odpowiednich działów zakładu w postaci ekspertyzy (**III.M.1.**).

Warto nadmienić, że w czasie studiów doktoranckich byłam wielokrotnie nagradzana za swoją pracę naukową, m.in. przez trzy lata byłam beneficjentem programu „Doctus – Małopolski fundusz stypendialny dla doktorantów”, którego celem było wspieranie młodych naukowców, których efekty badań mogą być wykorzystane w praktyce przez przedsiębiorstwa prowadzące działalność na terenie Województwa Małopolskiego (**III.D.1.**), otrzymałam także stypendium naukowe Miasta Krakowa (**III.D.2.**), oraz stypendia własne UR Kraków dla szczególnie uzdolnionych doktorantów (**III.D.3.**, **III.D.4.**, **III.D.5.**). Ponadto uchwałą Rady Wydziału Rolniczo-Ekonomicznego UR Kraków moja praca doktorska została wyróżniona (**II.J.1.**).

5.2. Po uzyskaniu stopnia doktora (2013-2018)

Moja aktywność naukowa w okresie po uzyskaniu stopnia naukowego doktora skupia się na mikrobiologii środowiskowej obejmującej następujące zagadnienia:

a) lekooporność drobnoustrojów (monitorowanie rozprzestrzeniania się oporności na antybiotyki wśród mikroorganizmów środowiskowych, izolowanych z powietrza, wód oraz od zwierząt)

Po uzyskaniu stopnia doktora i zatrudnieniu w Katedrze Mikrobiologii UR Kraków kontynuowałam współpracę z Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek w Krakowie, czego efektem była publikacja **II.A.3.**, w której przy pomocy metody dyfuzyjno-krażkowej a także z użyciem techniki PCR wykrywano oporność na metycylinę u gronkowców izolowanych z powietrza. Wyizolowano 65 szczepów należących do rodzaju *Staphylococcus*, zidentyfikowano 15 gatunków gronkowców koagulazo-ujemnych. Na podstawie porównania skuteczności wykrywania metycylinooporności przez obie metody stwierdzono, iż ich wyniki są zgodne jedynie w 36% badanych prób, a metoda dyfuzyjno-krażkowa generuje dużą liczbę fałszywie ujemnych wyników. Kolejną pracą zrealizowaną dzięki współpracy z CBMiA w Krakowie, opisującą występowanie lekoopornych gronkowców w centrach opieki zdrowotnej była publikacja **II.A.8.** a także **II.A.11.**, w której podobne badania przeprowadzono na szczepach wyizolowanych z powietrza pomieszczeń mieszkalnych w Krakowie. Jako że temat lekooporności drobnoustrojów środowiskowych bardzo mnie zainteresował rozpoczęłam także inne badania, których efektem były publikacje

opisujące: lekooporność ze szczególnym uwzględnieniem występowania genów ESBL i różnicowania genetycznego szczepów *E. coli* izolowanych z wód „Zalewu w Nowej Hucie” (**II.A.9.**), identyfikację gatunkową i ocenę lekooporności bakterii *Staphylococcus* spp. izolowanych z powietrza domu studenckiego UR Kraków (**II.D.11.**), analizę oporności na antymikotyki grzybów *F. culmorum* izolowanych z powietrza (**II.D.23.**), ocenę stanu sanitarnego wód użytku ekologicznego „Staw przy Kaczeńcowej” w Nowej Hucie z uwzględnieniem lekooporności bakterii *E. coli* izolowanych z tego zbiornika (**II.D.28.**). Ponadto wyniki moich badań dotyczące występowania lekoopornych szczepów *E. coli* w pomieszczeniu drobiowym były zarówno prezentowane w formie referatu na międzynarodowej konferencji na Uniwersytecie Mendla w Brnie (**II.K.9.**), jak i zostały opublikowane w formie rozdziału w anglojęzycznej monografii (**II.D.30.**).

Problem oporności drobnoustrojów na antybiotyki jest również mocno zaakcentowany w przedstawionych do oceny publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe. Część wspomnianych badań dotyczących koagulazo-ujemnych gronkowców izolowanych ze środowiska ośrodków jazdy konnej, które mogą być rezerwuarem lekooporności, w tym oporności na metycylinę, przedstawiłam na konferencji w Lublinie (**III.B.25.B.**). Moje zainteresowanie tematem rozprzestrzeniania się zjawiska lekooporności drobnoustrojów zaowocowało aktywnym uczestnictwem jako członek Komitetu Zarządzającego (Management Committee) w akcji COST ES1307 Sewage biomarker analysis for community health assessment (**II.I.1.**) oraz udziałem w grupie roboczej Working Group Two – Innovative techniques for community health assessment tej samej akcji (**II.I.2.**), a także jako członek grupy roboczej akcji COST ES1403 New and emerging challenges and opportunities in wastewater reuse (NEREUS) – Working Group One (**II.I.3.**). W ramach projektów COST uczestniczyłam w szkoleniach i spotkaniach grup roboczych oraz Management Committee (**III.A.1., III.A.2., III.A.3.**). Także jako członek Management Committee i grupy roboczej zorganizowałam spotkanie grupy Working Group Two, akcji COST ES1307, które odbyło się w dniach 10-12.02.2016 r. na Wydziale Rolniczo-Ekonomicznym Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie (**III.C.1.**). Wygłosiłam na nim również referat, gdzie przedstawiłam część wyników badań dotyczących wykrywania lekooporności u szczepów *E. coli* izolowanych z wód (**II.K.6.**), a które zostały sfinansowane dzięki uzyskanej przeze mnie Wydziałowej Dotacji Celowej dla Młodych Naukowców (**III.Q.2.C.**). Dzięki pozyskaniu przeze mnie kolejnej Wydziałowej Dotacji Celowej dla Młodych Naukowców (**III.Q.2.D.**) mogłam przeprowadzić badania polegające na molekularnej i fenotypowej analizie profilu lekooporności szczepów *E. coli* izolowanych z wód użytku ekologicznego „Staw przy

Kaczeńcowej” w Nowej Hucie i zaprezentować je na konferencji w Lublinie (**III.K.25.A.**). Przeprowadzone badania pozwoliły na wyizolowanie 60 szczepów *E. coli*, które najczęściej posiadały oporność na tetracyclinę i ampicylinę. Mimo, iż stwierdzono obecność szczepów wielolekoopornych, mechanizmu ESBL nie wykryto, natomiast dzięki zastosowaniu techniki PCR stwierdzono obecność genów, tj. *blaTEM*, *blaOXA* i *blaSHV*, odpowiedzialnych za produkcję beta-laktamaz o rozszerzonym spektrum działania.

b) ocena stanu mikrobiologicznego powietrza, wód i gleby (badania wybranych ekosystemów pod kątem ich skażenia mikrobiologicznego, które może stanowić zagrożenie epidemiologiczne, a także ocena wpływu antropopresji na kształtowanie się składu mikrobiocenotycznego tych środowisk)

Dzięki nawiązanej jeszcze na studiach doktoranckich współpracy z zakładem ArcelorMittal Poland powstała publikacja **II.A.2.**, w której omówiono zróżnicowanie genetyczne bakterii *Azotobacter* spp. izolowanych z gleb rolniczych i przemysłowych pobranych z terenu huty w oparciu o markery molekularne. Kolejnymi pracami opisującymi oddziaływanie zakładów przemysłowych na skład mikrobiocenotyczny gleby były: publikacja **II.A.7.**, również zrealizowana w kooperacji z ArcelorMittal Poland, w której uzyskano wyniki wskazujące na to, że drobnoustroje żyjące w glebach zanieczyszczonych metalami ciężkimi mogą charakteryzować się niewrażliwością na podwyższone ich stężenia, a także manuskrypt **II.D.16.**, dotyczący liczebności i różnorodności drobnoustrojów izolowanych z gleb stanowiących otulinę zakładu przemysłowego. W swoim dorobku posiadam także publikację **II.D.20.**, w której analizuję bioróżnorodność mikroorganizmów glebowych w wybranych punktach Krakowa usytuowanych przy głównych arteriach komunikacyjnych miasta oraz pracę **II.D.26.**, opisującą wpływ sposobu użytkowania gleby na występowanie i liczebność wybranych grup drobnoustrojów ją zasiedlających. Wyniki wyżej opisanych badań (**II.D.20.**, **II.D.26.**) zostały także przedstawione w formie referatów na konferencjach w Dobczycach (**II.K.5.**) i Krakowie (**II.K.7.**).

W moich badaniach często pochylam się nad problemem mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza, przykładem tego typu aktywności jest publikacja dotycząca oceny występowania bioaerozolu i poziomu zapylenia w wybranych pomieszczeniach kampusu UR Kraków (**II.A.13.**). Wyniki tych analiz zaprezentowałam także na 50 Jubileuszowej Konferencji Mikrobiologii Środowiskowej „Mikroorganizmy w ochronie środowiska i biotechnologii” w Sieniawie (**III.B.16.A.**), którą współorganizowałam (**III.C.2.**). Przeprowadzone badania dostarczyły interesujących wyników mówiących o tym,

że spośród analizowanych pomieszczeń uniwersyteckich, w skład których wchodziły sale wykładowe, gabinety pracowników, sale ćwiczeniowe i laboratoryjne, największe mikrobiologiczne zanieczyszczenie powietrza odnotowano w laboratorium biomasy, co powiązano z charakterem badań tam wykonywanych. Natomiast nie stwierdzono jednoznacznych zależności pomiędzy stężeniem mikroorganizmów bytujących w powietrzu a rodzajem zastosowanej w budynkach wentylacji. Normy stężenia pyłu zawieszonego PM₁₀ i PM_{2,5} przekraczały wartości graniczne i tym samym powietrze zakwalifikowano jako zanieczyszczone. W pobranym powietrzu wykryto obecność gronkowców wielolekoopornych, które mogą stanowić zagrożenie epidemiologiczne dla przebywających w badanych pomieszczeniach ludzi. Publikacjami o pokrewnej tematyce są niewątpliwie te, dotyczące obecności grzybów pleśniowych w powietrzu budynków użyteczności publicznej w Krakowie (**II.D.15.**), czy też oceny narażenia osób uprawiających sport w wybranych punktach Krakowa na aerozol mikrobiologiczny (**II.D.17.**). Innym obszarem mojej aktywności naukowej jest ocena jakości mikrobiologicznej wód, czego przykładem jest publikacja **II.D.25.** oraz zaprezentowane na konferencji w Dobczycach doniesienie (**III.B.15.**), gdzie na podstawie okresowego występowania w wodzie „Zalewu w Nowej Hucie” mikrobiologicznych wskaźników czystości, oceniałam jej jakość. Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, że na liczebność badanych drobnoustrojów wpływała zarówno zmieniająca się temperatura wody jak i powietrza oraz użytkowanie w sezonie wakacyjnym zalewu w charakterze kąpieliska przez okolicznych mieszkańców. W pobranych próbkach zidentyfikowano wszystkie badane wskaźniki czystości mikrobiologicznej wód, które stanowią potencjalne zagrożenie dla kąpiących się w zbiorniku ludzi. Dlatego na tej podstawie rekomendowano objęcie wód „Zalewu w Nowej Hucie” stałym monitoringiem sanitarnym.

c) wykorzystanie odpadów jako alternatywnego źródła energii, możliwości przetwarzania, higienizacji i stabilizacji składowanych w zakładach przemysłowych odpadów, ocena bioróżnorodności mikroorganizmów zasiedlających odpady komunalne i organiczne

Moje zainteresowanie problematyką przetwarzania odpadów komunalnych, ich szkodliwym oddziaływaniem na środowisko i charakterystyką mikroorganizmów zasiedlających odpady, zostało zapoczątkowane wraz z nawiązaniem współpracy z Wydziałem Inżynierii Produkcji i Energetyki UR Kraków (**III.Q.3.B.**). Efektem tych działań był szereg publikacji dotyczących: procesu biosuszenia odpadów i jego wpływu na właściwości energetyczne odpadów i zasiedlenie przez mikroorganizmy (**II.A.10.**),

zanieczyszczenia mikrobiologicznego powietrza w sąsiedztwie zakładów składających i przetwarzających odpady (**II.D.18.**), samonagrzewania się paliwa alternatywnego wytwarzanego ze zmieszanych odpadów komunalnych (**II.D.19.**) oraz charakterystyki nielegalnych wysypisk odpadów komunalnych (**II.D.21.**). Ponadto dzięki udziałowi jako wykonawca w projekcie Gekon – Generator Koncepcji Ekologicznych o numerze GEKON2/05/268002/17/2015, EkoRDF – innowacyjna technologia wytwarzania paliwa alternatywnego z odpadów komunalnych dla elektrowni i elektrociepłowni – kluczowym elementem systemu gospodarki odpadami w Polsce (**II.I.4.**), zdobyłam nowe i niezwykle cenne doświadczenie zawodowe, poszerzyłam swój warsztat badacza, a także nawiązałam kolejną współpracę naukową, m.in. z Katedrą Technologii Nieorganicznej i Biotechnologii Środowiska Politechniki Krakowskiej (**III.Q.3.D.**), w zakresie oceny możliwości zastosowania technologii ozonowania, jako potencjalnej metody stabilizacji i higienizacji zmieszanych odpadów komunalnych (publikacja **II.A.12.**) oraz z Zakładem Technologii Plazmowych i Energii Odnawialnej Politechniki Lubelskiej (**III.Q.3.E.**), w zakresie oceny możliwości zastosowania technologii obróbki plazmatycznej w tym samym celu (publikacja **II.D.27.**, referat na konferencji **II.K.8.**). Wymiernym efektem przeprowadzonych w toku realizacji projektu analiz były rekomendacje mówiące o możliwościach zastosowania plazmy niskotemperaturowej i procesu ozonowania jako metod stabilizacji odpadów. Stwierdzono, iż efektywność higienizacji przy pomocy ozonowania zależała od tego, czy procesowi poddawana była frakcja ciężka, czy frakcja lekka odpadów. Ponadto, na eliminację mikroorganizmów wpływ miało prowadzone dodatkowo suszenie próbek, które przyczyniło się do znacznego spadku ich wilgotności. Dlatego zalecono szereg modyfikacji dotyczących parametrów procesu ozonowania, dzięki którym proponowana metoda mogłaby być stosowana w celu higienizacji surowców służących do produkcji paliwa alternatywnego. Natomiast w przypadku zastosowania plazmy niskotemperaturowej stwierdzono, że spośród testowanych wariantów procesowych, to 15 minutowy kontakt plazmy z badanymi surowcami przyczynia się do ich higienizacji. Pokłosiem mojego uczestnictwa w projekcie Gekon, była także publikacja **II.D.24.** opisująca wpływ tlenowej stabilizacji odpadów na ich właściwości energetyczne i zasiedlenie przez wybrane grupy mikroorganizmów oraz udział w konferencjach, gdzie prezentowałam wyniki badań dotyczące wpływu dodatku wapna palonego (**III.B.16.B.**) i działania plazmy niskotemperaturowej (**III.B.21.**) na higienizację i stabilizację odpadów komunalnych. Uczestniczyłam także w wielu konferencjach zarówno krajowych, jak i międzynarodowych, których tematyka związana była z przetwarzaniem odpadów i ich oddziaływaniem na środowisko, gdzie prezentowałam wyniki badań opisujące

wpływ procesu biosuszenia odpadów na ich właściwości energetyczne i skład mikrobiocenotyczny (**III.B.14.**, **III.B.17.**).

W wyniku nawiązania współpracy z Uniwersytetem Mendla w Brnie (**III.Q.3.F.**) i pozyskaniu stypendium z Własnego Funduszu Stypendialnego UR Kraków (**III.D.6.**) mogłam wyjechać na miesięczny zagraniczny staż naukowy (**III.L.4.**) i tam zrealizować projekt dotyczący oceny składu mikrobiocenotycznego populacji drobnoustrojów zasiedlających odpady organiczne oraz wykonać eksperymenty, których celem było określenie wpływu dodatku biowęgla drzewnego na przebieg procesu kompostowania oraz jakość wytworzonego kompostu. Część uzyskanych wyników została już zaprezentowana na międzynarodowej konferencji w Krynicy (**III.B.23.**), a także zostanie opublikowana (artykuł w recenzji). Zdobyte w trakcie stażu naukowego umiejętności i pozyskana wiedza zmobilizowały mnie do podjęcia kolejnego tematu badawczego związanego z możliwością zastosowania biowęgla zarówno w procesie kompostowania, jak i jako dodatku do gleb rolniczych celem poprawy ich jakości uprawnej, co przyczyniło się do nawiązania współpracy z Katedrą Chemii Rolnej i Środowiskowej UR Kraków (**III.Q.3.G.**), a także umożliwiło wykonanie analiz, których wyniki zaprezentowano na konferencji w Puławach (**III.B.18.**). Zainteresowanie problematyką szerokiego potencjału aplikacyjnego biowęgla zaowocowało moim udziałem jako wykonawcy w projekcie Miniatura o numerze G-1601/IIRiI-ZITiE/18-19, finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki (**II.I.5.**), gdzie zajmuję się oceną wpływu dodatku biowęgla na występowanie i liczebność wybranych grup mikroorganizmów zasiedlających odpady komunalne podczas procesu stabilizacji tlenowej. Warto wspomnieć także o ostatnio podjętym przeze mnie temacie badawczym skupiającym się na możliwości zastosowania biopreparatów oraz pofermentu pozyskiwanego z biogazowni rolniczych jako środków poprawiających wydajność procesu przetwarzania bioodpadów, pierwsze obserwacje zostały już przedstawione na międzynarodowych konferencjach (**III.B.22.**, **III.B.24.**).

d) ocena bakteriobójczych i przeciwgrzybiczych właściwości nanostruktur (opracowanie nowoczesnych technologii otrzymywania oraz charakterystyka nanocząstek metali szlachetnych w celu wytworzenia bakteriobójczych i przeciwgrzybiczych preparatów nowej generacji, bezpiecznych dla środowiska naturalnego)

Badania realizowane dzięki współpracy z Katedrą Technologii Nieorganicznej i Biotechnologii Środowiska Politechniki Krakowskiej (**III.Q.3.A.**, **III.Q.3.C.**) w zakresie oceny toksyczności nanocząstek srebra względem grzybów pleśniowych i chorobotwórczych bakterii pozwoliły mi powiększyć dorobek publikacyjny o kolejne prace: **II.D.22.** – gdzie dla

szczepów *F. culmorum* izolowanych z powietrza wyznaczyłam MIC nanosrebra na poziomie 30 ppm oraz **II.D.29.** – gdzie już przy stężeniu 5 ppm nanosrebra dochodziło do zahamowania wzrostu izolowanych z odpadów komunalnych bakterii *E. coli*, natomiast maksymalne zastosowane stężenie (125 ppm) zdołało zahamować wzrost 94 % izolatów. Wymiernym efektem opisywanej współpracy była także możliwość zaprezentowania zgromadzonych wyników badań na konferencjach zarówno krajowych (**III.B.20.**) jak i międzynarodowych (**III.B.19.**). Ponadto, dzięki uprzejmości i życzliwości pracowników Politechniki Krakowskiej, w trakcie miesięcznego stażu naukowego (**III.L.5.**) mogłam poszerzyć swoją wiedzę zarówno w zakresie inżynierii materiałowej, technologii chemicznej i szerokokorozumianej biotechnologii, a także zapoznać się z metodami otrzymywania nanocząstek metali, które zastosowano w badaniach opisanych później w publikacjach przedstawionych do oceny jako osiągnięcie naukowe.

Pozostałymi publikacjami wchodzącymi w skład mojego dorobku naukowego, a nie będącymi ściśle związanymi z przedstawionymi powyżej głównymi nurtami badawczymi, są analizy zapoczątkowane jeszcze w okresie studiów doktoranckich, a dotyczące składu gatunkowego i molekularnej charakterystyki potencjału toksynotwórczego grzybów *Fusarium* spp. izolowanych z pszenicy w Małopolsce (**II.A.6.**). Podobnie publikacja **II.D.14.**, w której oceniłam przydatność dwóch metod genotypowania *Streptococcus agalactiae*: ITS-PCR i PCR-MP, powstała na początku mojej zawodowej drogi i jest niewątpliwie efektem poszukiwań naukowych. Natomiast w ramach kolejnej uzyskanej przeze mnie Wydziałowej Dotacji Celowej dla Młodych Naukowców (**III.Q.2.B.**) mogłam zrealizować badania, dotyczące występowania alternariozy ziemniaka w Małopolsce i roli chrząszczy stonki ziemniaczanej w jej rozprzestrzenianiu, wyniki analiz zostały opublikowane (**II.D.12.**) i zaprezentowane w postaci referatu na konferencji w Krakowie (**II.K.3.**). Ponadto w ramach poszerzania interdyscyplinarności moich badań podjęłam współpracę z naukowcami z Katedry Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej UR Kraków (**III.Q.3.H.**), której efektem było napisanie i złożenie projektu badawczego na konkurs Lider IX, organizowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (**II.I.6.**). Wniosek został oceniony pozytywnie i skierowany do finansowania. Mój udział w projekcie polegał będzie m.in. na kontrolowaniu czystości mikrobiologicznej procesów zachodzących w warzelnii i fermentowni, doborze optymalnych parametrów fermentacji i dojrzewania piwa oraz ocenie stanu fizjologicznego drożdży.

Warto także nadmienić, że po uzyskaniu stopnia doktora, pracując na stanowisku asystenta, a następnie adiunkta, byłam wyróżniana za swoją pracę naukową, dwukrotnie Nagrodą Indywidualną III^o (II.J.2., II.J.3.) i raz Nagrodą Indywidualną II^o (II.J.4.) Rektora Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie za wybitne osiągnięcia w dziedzinie naukowej.

Podsumowanie bibliometryczne osiągniętego dorobku publikacyjnego

Wyszczególnienie	Przed doktoratem			Po doktoracie			Łącznie		
	Liczba	Punkty wg MNiSW	IF	Liczba	Punkty wg MNiSW	IF	Liczba	Punkty wg MNiSW	IF
Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	–	–	–	7	140	9,331	7	140	9,331
Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie JCR (lista A MNiSW)	1	20	1,216	12	255	16,375	13	275	17,591
Publikacje naukowe w czasopismach innych niż znajdujących się w bazie JCR (lista B MNiSW)	5	28	–	22	160	–	27	188	–
Razem	6	48	1,216	41	555	25,706	47	603	26,922
Rozdziały w monografiach	2	–	–	1	–	–	3	–	–
Liczba cytowań (bez autocytowań) wg bazy Web of Science	–	–	–	–	–	–	38	–	–
Indeks Hirscha wg bazy Web of Science	–	–	–	–	–	–	4	–	–

Kraków, 5.11.2018 r.

Katarzyna Wdnyk-Kozalca

Podpis Wnioskodawcy