



Szymon Frąk

Ocena skuteczności działania i cyklu życia
preparatów dezynfekujących opracowanych dla
przemysłu spożywczego z wykorzystaniem
ekstraktów roślinnych

Evaluation of the effectiveness and life cycle of
disinfectants developed for the food industry using
plant extracts

Praca doktorska

Promotor: dr hab. inż. Daniela Gwiazdowska, prof. UEP

Promotor pomocniczy: dr inż. Krzysztof Juś

Pracę przyjęto dnia:

Podpisy Promotorów

Poznań 2024

*Serdeczne podziękowania kieruję do **Pani dr hab. inż. Danieli Gwiazdowskiej** oraz do **Pana dr inż. Krzysztofa Juś**, którzy byli nieocenioną siłą i wsparciem podczas realizacji mojej pracy doktorskiej. Dziękuję za Waszą cenną pomoc, mądrość oraz zaangażowanie, które pozwoliły mi rozwijać się naukowo i osobowo. Dziękuję również **Pani dr hab. inż. Annie Lewandowskiej** za pomoc w realizacji badań dotyczących LCA.*

*Pracę dedykuję **Źonie i Rodzicom**, w podziękowaniu za wiarę i wsparcie w najtrudniejszych chwilach.*

Spis treści

Wykaz najważniejszych skrótów	6
Wstęp	8
Część teoretyczna	15
1. Zagrożenia bezpieczeństwa żywności w przemyśle spożywczym	15
1.1. Rozwój przemysłu spożywczego w Polsce i Europie	15
1.2. Charakterystyka głównych zagrożeń w przemyśle spożywczym	18
1.3. Analiza zagrożeń bezpieczeństwa żywności według systemu RASFF	22
1.4. Najczęściej występujące zagrożenia mikrobiologiczne w przemyśle spożywczym według systemu RASFF	29
2. Zarządzanie bezpieczeństwem żywności	38
2.1. Uwarunkowania prawne bezpieczeństwa żywności w Polsce	38
2.2. Normy i podejście systemowe w zarządzaniu jakością mikrobiologiczną żywności	40
3. Procesy mycia i dezynfekcji w przemyśle spożywczym	43
3.1. Systematyczny przegląd literatury w obszarze środków dezynfekujących w przemyśle spożywczym	45
3.2. Chemiczne metody dezynfekcji	47
3.3. Biologiczne i fizyczne metody dezynfekcji	56
Część empiryczna	64
4. Cele i hipotezy badawcze	64
5. Metodyka badawcza	66
5.1. Materiał badawczy, odczynniki, mikroorganizmy wskaźnikowe	66
5.2. Otrzymywanie ekstraktów roślinnych	68
5.3. Oznaczenie całkowitej zawartości związków polifenolowych	70
5.4. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe ekstraktów	71
5.5. Opracowanie składu środka dezynfekującego zawierającego pozyskane substancje roślinne	74
5.6. Ocena cyklu życia (LCA).....	74
5.7. Analiza statystyczna wyników badań.....	80
6. Wyniki i dyskusja	81
6.1 Właściwości przeciwdrobnoustrojowe handlowych olejków i ekstraktów roślinnych	81
6.2. Właściwości biologiczne otrzymanych ekstraktów.....	93
6.4. Ocena wpływu cyklu życia	122
Podsumowanie i wnioski	147
Bibliografia	154
Wykaz wykresów.....	172
Wykaz Fotografii	172
Wykaz rysunków	173
Wykaz Tabel	173

Wykaz najważniejszych skrótów

ADP	potencjał uszczuplenia zasobów abiotycznych (ang. <i>Abiotic Depletion Potential</i>)
AOAC	Stowarzyszenia Urzędowych Chemików analitycznych (ang. <i>Association of Official Analytical Chemists</i>)
ATCC	Amerykańska Kolekcja Kultur (ang. <i>American Type Culture Collection</i>)
BIP	Biuletyn Informacji Publicznej
BRC	Brytyjskie Konsorcjum Detalistów (ang. <i>British Retail Consortium</i>)
CAR	karwakrol
CBD	kannabidiol
CBG	kannabigerol
CFU	jednostka tworząca kolonię (ang. <i>colony-forming unit</i>)
ECDC	Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ang. <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>)
EFSA	Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. <i>European Food Safety Authority</i>)
EPS	zewnątrzkomórkowe substancje polimerowe (ang. <i>extracellular polymeric substances</i>)
GAE	równoważnik kwasu galusowego
GHP	Dobra Praktyka Higieniczna (ang. <i>Good Hygienic Practice</i>)
GLO	ogólnoświatowy (ang. <i>Global</i>)
GMP	Dobra Praktyka Produkcyjna (ang. <i>Good Manufacturing Practice</i>)
GRAS	uważane za bezpieczne (ang. <i>Generally Recognised As Safe</i>)
GWP	wskaźnik potencjału tworzenia efektu cieplarnianego (ang. <i>Global Warming Potential</i>)
HACCP	Analizę Zagrożeń i Krytyczne Punkty Kontroli (ang. <i>Hazard Analysis and Critical Control Points</i>)
IFS	standardy audytowania dostawców/wytwórców dla Handlowców Detalicznych i Hurtowych produktów spożywczych (ang. <i>International Featured Standards</i>)
ISO	Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (ang. <i>International Organization for Standardization</i>)
JF	jednostka funkcjonalna

JRC	Wspólne Centrum Badawcze (ang. <i>Joint Research Centre</i>)
KOWR	Krajowy Ośrodek Wsparcia Rolnictwa
LCA	ocena cyklu życia (ang. <i>Life Cycle Assessment</i>)
LCI	analiza zbioru wejść i wyjść cyklu życia (ang. <i>Life Cycle Inventory</i>)
LCIA	Ocena wpływu cyklu życia (ang. <i>Life Cycle Impact Assessment</i>)
MBC	Minimalne stężenie bakteriobójcze (ang. <i>minimum bactericidal concentration</i>)
MIC	Minimalne stężenie hamujące (ang. <i>Minimal Inhibitory Concentration</i>)
NIK	Najwyższa Izba Kontroli
PAA	kwas nadoctowy (ang. <i>Peracetic acid</i>)
PARP	Polska Agencja Rozwoju Przedsiębiorczości
PDI	inaktywacja fotodynamiczna (ang. <i>photodynamic inactivation</i>)
PFA	kwas mrówkowy (ang. <i>Performic Acid</i>)
QAC	czwartorzędowe związki amoniowe
RASFF	System Wczesnego Ostrzegania o Niebezpiecznych Produktach Żywnościowych i Środkach Żywienia Zwierząt (ang. <i>Rapid Alert System for Food and Feed</i>)
RoW	reszta świata (ang. <i>Rest of world</i>)
SALSA	Metoda systematycznego przeglądu literatury (ang. <i>Search, Appraisal, Synthesis, Analysis</i>)
SC-CO ₂	ekstrakcja w nadkrytycznym CO ₂ (ang. <i>supercritical carbon dioxide</i>)
UAE	ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (ang. <i>Ultrasound Assisted Extraction</i>)
UE	Unia Europejska
UV	promieniowanie ultrafioletowe (ang. <i>ultraviolet radiation</i>)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i>)
WWA	wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne
ZSZJ	Zintegrowany system zarządzania jakością

Wstęp

Problem obecności patogennych bakterii w większości gałęzi przemysłu spożywczego stanowi poważne, a zarazem niestabilne zagrożenie dla zdrowia i życia konsumentów (Zhao i in., 2017; RASFF, 2022). Niepoprawnie prowadzone procesy mycia i dezynfekcji powierzchni abiotycznych, niewłaściwy dobór środków chemicznych lub ich stężeń, brak wiedzy na temat mikroorganizmów charakterystycznych dla konkretnych branż przemysłu spożywczego i wreszcie mechanizmy uodparniania się drobnoustrojów na stosowane substancje to najważniejsze z czynników odpowiedzialnych za taki stan rzeczy. Odzwierciedleniem skali problemu zanieczyszczeń mikrobiologicznych w żywności są zgłoszenia do systemu RASFF, które jasno wskazują, że zagrożenie ze strony bakterii patogennych na przestrzeni ostatniej dekady nie tylko nie słabnie, ale wręcz narasta (RASFF, 2022). Niepokojący wydaje się szczególnie fakt, że to właśnie wobec żywności pochodzącej z Polski, w ciągu minionych trzech lat, zgłoszonych zostało najwięcej uchybień w jakości mikrobiologicznej (RASFF, 2010-2022). Wobec tego, niezbędne jest poszukiwanie i wdrażanie nowych rozwiązań w obszarze zarządzania bezpieczeństwem mikrobiologicznym żywności na rzecz poprawy zaistniałego stanu rzeczy.

Producenci żywności, funkcjonujący w polskich realiach rynkowych, kontrolowani są przez instytucje takie jak: Państwowa Inspekcja Sanitarna, Inspekcja Weterynaryjna, Inspekcja Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych oraz Państwowa Inspekcja Ochrony Roślin i Nasiennictwa. Organy te mogą prowadzić kontrolę producentów żywności, w razie nieprawidłowości nakładać na nie sankcje, a w skrajnych przypadkach czasowo zamknąć zakład produkcyjny, w którym rażąco zaniedbano kwestie bezpieczeństwa żywności. Dodatkowo, trudno wyobrazić sobie funkcjonowanie producentów żywności, będących podmiotami rynku europejskiego, którzy nie wprowadzają w swoich zakładach nieobowiązkowych norm branżowych, np.: z serii ISO. Pomimo to, problem zakażeń żywności nadal funkcjonuje, a jego skala na terenie naszego kraju jest alarmująca, co może wskazywać na problem nie tyle w obszarze samego zarządzania bezpieczeństwem mikrobiologicznym żywności, co w obszarze stosowanych środków dezynfekujących.

W celu zmniejszenia stopnia zagrożenia mikrobiologicznego, wraz z prowadzeniem coraz dokładniejszych kontroli oraz rozwijaniem wymagań systemów zarządzania (np.: ISO serii 22000, standardy GMP, GHP), jednym z dodatkowych, możliwych sposobów przeciwdziałania

wspomnianemu problemowi zanieczyszczeń żywności jest poszukiwanie nowych, skutecznych substancji, mogących zastąpić lub wspierać powszechnie stosowane w dezynfekcji związki chemiczne. To właśnie w tym obszarze, jak wskazano w jednej z części niniejszej pracy doktorskiej, skupia się tak duża liczba artykułów naukowych traktujących o środkach dezynfekujących.

Prace badawcze nad niekonwencjonalnymi, nowymi środkami dezynfekującym, wydają się nie tylko fascynujące, ale i niezbędne. Coraz częściej zwraca się uwagę na nadmierne stosowanie popularnych, biobójczych związków chemicznych, które używane w złe dobranym stężeniu przyczyniają się do wzmagania mechanizmów oporności wśród mikroorganizmów. Dlatego też zainteresowanie substancjami o odmiennym mechanizmie działania niż chlor, czwartorzędowe sole amoniowe czy kwas nadoctowy jest tak duże (Donaghy i in., 2019; Yim i in., 2021). Coraz większa część badaczy wskazuje również na istotność aspektu ekologicznego w obszarze dezynfekcji i potrzebę poszukiwania rozwiązań mniej szkodliwych dla zdrowia ludzi i środowiska, a przy tym niepowodujących korozji urządzeń i maszyn, jak ma to miejsce w przypadku np.: związków chloru (Fukuzaki, 2006; Telesiński i in., 2016). Systematyczny przegląd literatury przeprowadzony w ramach niniejszej rozprawy wskazuje na możliwość potencjalnego wykorzystania do dezynfekcji nowatorskich rozwiązań, m. in.: wody elektrolizowanej, fagów, enzymów i kwasów organicznych (Jeon, Kwon, i Yoon, 2018; Tomat i in., 2018; Ripolles-Avila i in., 2020; Akbai i Cag, 2016). Obiecującymi, a przy tym niewpływającymi na wytwarzanie mechanizmów oporności bakterii są również związki pochodzenia naturalnego – olejki eteryczne i ekstrakty pozyskiwane z roślin (Falcó i in., 2019). Wielokrotnie udowodniono ich potencjał przeciwdrobnoustrojowy, można je łatwo wyizolować z materiału roślinnego, a do tego z łatwością ulegają rozkładowi w wodzie (Kavanaugh i Ribbeck, 2012).

Podążając tym nurtem, w niniejszej pracy doktorskiej, podjęto badania nad stworzeniem formułacji środka dezynfekującego mogącego stanowić skuteczną alternatywę dla przemysłu spożywczego. W ramach dysertacji postawiono pytanie badawcze o to:

**jakie są możliwości wykorzystania substancji roślinnych jako czynnika dezynfekującego
w przemyśle spożywczym,**

natomiast za główny cel obrano:

**stworzenie formułacji skutecznego środka dezynfekującego dla przemysłu spożywczego
z wykorzystaniem ekstraktów roślinnych.**

Założeniem było zaproponowanie formułacji na tyle skutecznej, aby mogła spełniać wymagania normatywne stawiane przed środkami dezynfekującymi, stosowanymi w przemyśle spożywczym, a przy tym mniej obciążającej środowisko naturalne niż tradycyjnie stosowane środki biobójcze, w myśl tak zwanego „ekoprojektowania”. W nawiązaniu do pytania badawczego sformułowano następujące hipotezy:

H1: Ekstrakty roślinne charakteryzują się właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi i antybiofilmowymi w stosunku do mikroorganizmów stanowiących największe zagrożenie w przemyśle spożywczym,

H2: Formułacje środków dezynfekujących zawierające ekstrakty roślinne jako główny czynnik przeciwdrobnoustrojowy są skuteczne w dezynfekcji powierzchni abiotycznych i mogą zostać uznane za skuteczny środek dezynfekujący zgodnie z normą PN-EN 13697+A1:2015,

H3: Skuteczna formułacja dezynfekująca wykorzystująca ekstrakty CO₂ charakteryzuje się najmniejszym obciążeniem środowiskowym spośród stworzonych wariantów,

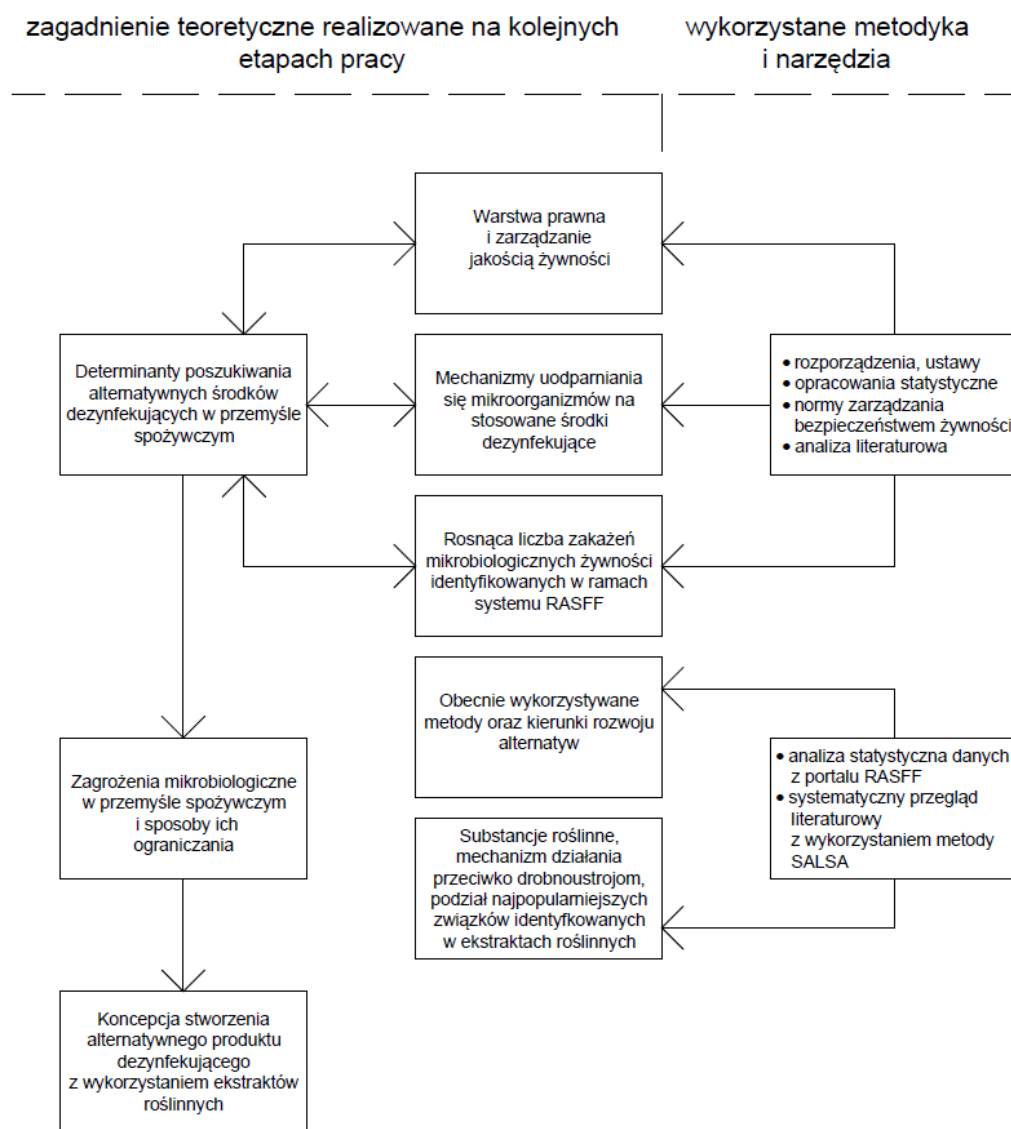
H4: Opracowane preparaty dezynfekujące charakteryzują się mniejszym wskaźnikiem obciążenia środowiskowego liczonego z wykorzystaniem metody LCA, niż popularne dezynfektanty dostępne w handlu (podchloryn sodu, kwas nadoctowy i kwas nadmrówkowy).

Weryfikację hipotez wspierały następujące cele szczegółowe, których realizacja znajduje odzwierciedlenie w części badawczej niniejszej rozprawy doktorskiej:

C1: Ocena właściwości przeciwdrobnoustrojowych wybranych ekstraktów CO₂ i olejków roślinnych dostępnych w handlu,

- C2:** Ocena właściwości przeciwdrobnoustrojowych i antybiofilmowych pozyskanych laboratoryjnie różnymi metodami ekstraktów z roślin: gojnika (*Sideritis Scardica*), oregano (*Origanum vulgare*) oraz konopi (*Cannabis S. Sativa* i *Cannabis S. Indica*),
- C3:** Opracowanie formułacji środka dezynfekującego zawierającego ekstrakty roślinne, o najsilniejszym potencjale przeciwdrobnoustrojowym i antybiofilmowym,
- C4:** Ocena możliwości zastosowania opracowanego preparatu oraz zakwalifikowania go jako skutecznego środka dezynfekującego w przemyśle spożywczym według normy: PN-EN 13697+A1:2015,
- C5:** Analiza cyklu życia (LCA) opracowanych formułacji środków dezynfekujących zawierających substancje roślinne i porównanie go pod tym względem do środków dostępnych w handlu.

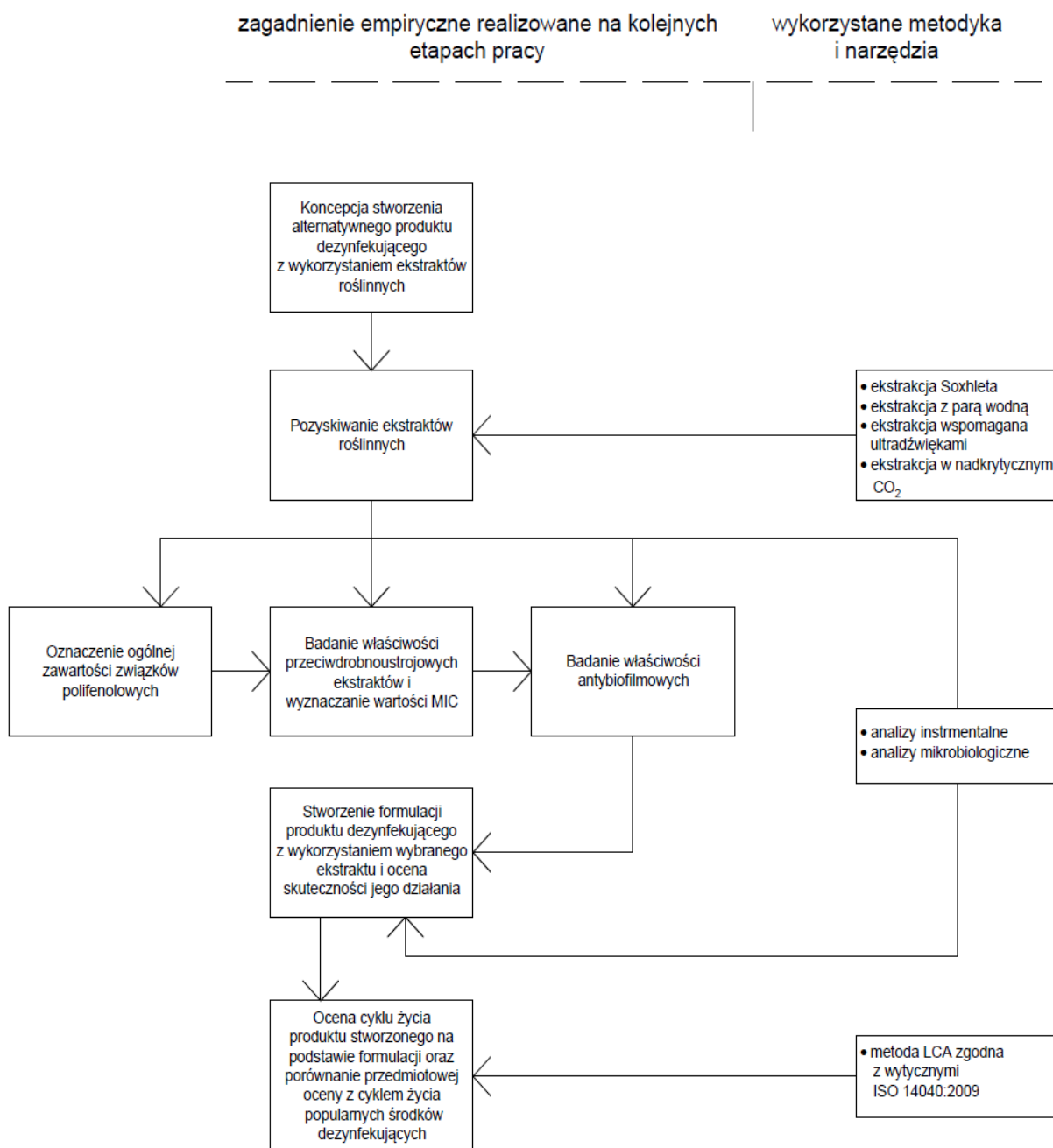
Praca została podzielona tradycyjnie na część teoretyczną oraz empiryczną. Pierwsza, teoretyczna, obejmowała kluczowe zagadnienia związane z realizowanym tematem pracy. W pierwszej kolejności przybliżono czytelnikowi czynniki fizyczne, chemiczne oraz przede wszystkim biologiczne, mogące stanowić zagrożenie zdrowia i życia konsumentów. Dalej przeprowadzono analizę zgłoszeń do europejskiego systemu RASFF, dotyczących zagrożeń mikrobiologicznych. Scharakteryzowano także wymagania prawne dotyczące bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności, wymagania branżowe, a także procesy składające się na zapewnienie czystości mikrobiologicznej wewnątrz zakładów produkcyjnych. Część teoretyczna, poza funkcją poznawczą i opisową poruszanego tematu, stanowiła argumentację potrzeb prowadzenia badań w obszarze środków do dezynfekcji. Na jej podstawie wyodrębniono główne determinanty poszukiwania nowych, alternatywnych rozwiązań w zakresie neutralizowania zagrożeń mikrobiologicznych w przemyśle spożywczym. Ponadto, w ramach części teoretycznej przeprowadzono również systematyczny przegląd literaturowy metodą SALSA, wskazujący kierunki najnowszych badań w obszarze tradycyjnych i alternatywnych substancji dezynfekujących mogących mieć zastosowanie dla przemysłu spożywczego. Schemat części teoretycznej prezentowanej rozprawy doktorskiej przedstawiono na rysunku W.1., zamieszczonym poniżej.



Rysunek W.1. Schemat realizacji części teoretycznej

Źródło: opracowanie własne

W części drugiej zaprezentowano zestawienie celów szczegółowych oraz hipotez, a także metodykę eksperymentów przeprowadzanych w celu zrealizowania koncepcji stworzenia alternatywnego preparatu dezynfekującego. Następnie przedstawiono wyniki badań empirycznych w kolejności ich rzeczywistego wykonywania zgodnie ze schematem zamieszczonym na rysunku W.2.



Rysunek W.2. Schemat realizacji części badawczej

Źródło: opracowanie własne

Pierwszy etap pracy doktorskiej realizowany w ramach części badawczej obejmował ocenę właściwości przeciwdrobnoustrojowych i antybiofilmowych związków roślinnych. W ramach badań pilotażowych analizie poddano olejki eteryczne i ekstrakty CO₂ dostępne w handlu. Zakupione do badań produkty pochodziły z: lawendy, kadzidłowca, rozmarynu, oregano, melisy, mięty oraz olejki i ekstrakty CBD z konopi siewnych. Badania z wykorzystaniem handlowych substancji miały charakter pilotażowy, a ich celem było

wskazanie rodzajów roślin, z których pozyskane substancje mają największy potencjał przeciwdrobnoustrojowy. Na podstawie badań pilotażowych, danych literaturowych a także prowadzonych równoległe oznaczeń wybrano następujące rośliny: oregano, gojnik i konopie siewne w dwóch odmianach (*Sideritis Scardica*, *Origanum vulgare*, *Cannabis S. Sativa* i *Cannabis S. Futura*). Do ekstrakcji wykorzystano cztery różne metody: klasyczną hydrodestylację, ekstrakcję Soxhleta, ekstrakcję z wykorzystaniem CO₂ w stanie nadkrytycznym oraz ekstrakcję w łaźni ultradźwiękowej.

Drugi etap obejmował badania pozyskanych ekstraktów pod względem ich potencjału przeciwdrobnoustrojowego i antybiofilmowego przeciw bakteriom patogennym występującym w przemyśle spożywczym. Badania pozwoliły na precyzyjne wyznaczenie minimalnego stężenia hamującego (MIC), a także stężenia pozwalającego na zahamowanie i usunięcie biofilmu bakteryjnego z powierzchni abiotycznych.

W kolejnym, trzecim etapie, podjęto próbę opracowania formuły środka dezynfekującego z wykorzystaniem pozyskanych ekstraktów roślinnych. Z uwagi na stosunkowo małe skomplikowanie chemicznych formuły preparatów chemicznych tego rodzaju wykorzystano podejście OFAT (z ang. *One Factor At a Time*). Po ustaleniu właściwej proporcji pomiędzy alkoholem etylowym, stężeniem związków roślinnych a wodą, zbadano właściwości przeciwdrobnoustrojowe oraz antybiofilmowe stworzonego środka dezynfekującego pod kątem spełnienia wymagań normy: PN-EN 13697+A1:2015.

Ostatnim etapem pracy badawczej była ocena cyklu życia (LCA) proponowanych formuły środków dezynfekujących, które na poprzednich etapach uzyskały status skutecznych preparatów, i porównanie wyników obciążenia środowiskowego (wyrażonego w wartości ekowskaźnika „single score”) do produktów najczęściej wykorzystywanych do dezynfekcji w przemyśle spożywczym (podchloryn, PFA, PAA). Zgodnie z wytycznymi normy ISO 14040, badanie LCA przeprowadzono metodą składającą się z czterech następujących faz (ISO 14040: 2009 Zarządzanie środowiskowe - Ocena cyklu życia - Zasady i struktura # 4.2): określenia celu i zakresu; analizy zbioru wejść i wyjść (LCI); oceny wpływu (LCIA) oraz fazy interpretacji wyników. Część empiryczna zwieńczona jest podsumowaniem, weryfikacją hipotez oraz wnioskami i wskazaniem ograniczeń podjętych badań.

Część teoretyczna

1. Zagrożenia bezpieczeństwa żywności w przemyśle spożywczym

1.1. Rozwój przemysłu spożywczego w Polsce i Europie

Branża spożywcza jest jedną z najważniejszych i najszybciej rozwijających się gałęzi polskiej gospodarki. Jak wskazuje PARP (2022), z analizy przeprowadzonej przez „Research and Markets” w 2021 roku wynika, że najpóźniej do 2025 r. rynek produktów spożywczych w Polsce przekroczy barierę 100 mld dolarów. Jest to zarazem najbardziej stabilna branża, na rozwój której nie miała większego wpływu nawet pandemia COVID-19. Według raportu Data&Trends 2021 (2022) Polska jest czwartym z kolei producentem żywności w Unii Europejskiej, zaraz po Francji, Niemczech i Hiszpanii. Powołując się na dane Krajowego Ośrodka Wsparcia Rolnictwa (KOWR, 2022), wartość eksportu polskiej żywności za granicę w 2022 r. wyniosła rekordowe 47,6 mld euro, co oznaczało wzrost o 26,7% w stosunku do 2021 r. Sprzedaż z Polski do państw należących do Unii Europejskiej wzrosła w o 29% i osiągnęła poziom 35,3 mld euro (74,1% całości sprzedaży). Natomiast eksport do państw spoza UE osiągnął wartość 12,3 mld euro i, w porównaniu do ubiegłego roku (10,3 mld euro), był to wzrost o 20,3% (35,9% całości sprzedaży). Największym partnerem handlowym Polski, podobnie jak w latach poprzednich, były Niemcy. Wartość polskiego eksportu na ten rynek wyniosła 11,9 mld euro i, w porównaniu z tym samym okresem w 2021 r., był to wzrost o 25,4% (w 2021 r. – 9 472 mln euro). Ponad 70% polskiego eksportu rolno-spożywczego trafia na rynki unijne. Eksport do Niemiec stanowił blisko 25% wartości polskiego eksportu rolno-spożywczego. Na drugim miejscu uplasowała się Wielka Brytania z udziałem na poziomie 7,7%. Wartość eksportu na rynek brytyjski wyniosła 3,7 mld euro, co oznaczało wzrost o 24,6% w porównaniu do 2021 r. Ważnymi odbiorcami żywności z Polski były także: Holandia (udział 6,5%), Francja (6,1%), Włochy (4,9%) oraz Republika Czeska (4,6%). Wartość importu artykułów rolno-spożywczych do Polski w 2022 r. wyniosła 32,1 mld euro, co oznaczało wzrost o 28,6% w porównaniu do 2021 r. (25 mld euro). Importowane do Polski artykuły rolno-spożywcze pochodziły głównie z Niemiec (udział w imporcie rolno-spożywczym ogółem – 19%), Ukrainy (8,6%), Holandii (7,7%), Włoch (5,3%) oraz z Hiszpanii (4,8%). W konsekwencji w 2022 r., w Polsce odnotowano dodatnie saldo obrotów handlowych towarami rolno-spożywczymi. Wyniosło ono 15,5 mld euro, co oznacza wzrost

o blisko 23%. Wartość całego sektora produkcji żywności, włączając produkcję na rynek rodzimy, przekroczyła natomiast 374 mld zł (82,12 mld EUR), co stanowi wartość ponad 26% udziału w produkcji przemysłowej w Polsce (Rynek żywności w Polsce w roku 2022, 2023).

Formalnie rynek żywności obejmuje wszystkie produkty jadalne, które są kupowane i spożywane w celach odżywczych, w tym zarówno świeżą, jak i przetworzoną żywność. Zwyczajowo dzieli się go na 13 segmentów, na które składają się następujące kategorie: produkty mleczne i jaja, produkty mięsne, ryby i owoce morza, owoce i orzechy, warzywa, pieczywo i produkty zbożowe, oleje i tłuszcze, sosy i przyprawy, żywność gotowa do spożycia, smarowidła i słodziki, wyroby cukiernicze i przekąski, żywność dla niemowląt, karma dla zwierząt. Odnosząc się do produkcji rodzimej, Polska jest największym europejskim producentem niektórych owoców, takich jak: jabłka, maliny, czarne porzeczki, borówki, a zarazem największym producentem mięsa drobiowego, przetworów mlecznych oraz pieczarek. Polska jest również w czołówce eksportu wyrobów czekoladowych, ziaren zbóż i produktów zbożowych, soków owocowych i warzywnych (Eurostat, 2022; Rynek żywności w Polsce w roku 2022; 2023).

Niewątpliwy sukces polskiego sektora branży spożywczej nie byłby możliwy bez odpowiedniego poziomu zapewnienia jakości i bezpieczeństwa produktów żywnościowych produkowanych na terenie naszego kraju. We wszystkich państwach Unii Europejskiej (UE) uchwalone normy prawne wprowadziły obowiązek wdrażania i stosowania systemów zapewnienia bezpieczeństwa jakości żywności. Do obligatoryjnych systemów należą: Dobra Praktyka Higieniczna (GHP), Dobra Praktyka Produkcyjna (GMP) i System Analizy Zagrożeń i Krytycznych Punktów Kontrolnych (HACCP). W Polsce konieczność wdrożenia GHP i GMP w podmiotach produkujących wyroby spożywcze obowiązuje od 20 lipca 2000 roku, a od 1 maja 2004 roku także systemu HACCP (Ustawa z 27 września 2006 roku o bezpieczeństwie żywności i żywienia, Dz.U. 2001, nr 31, poz. 265). Przedsiębiorstwa przemysłu spożywczego, obok obligatoryjnych systemów zarządzania jakością, mogą wdrożyć nieobligatoryjne systemy, takie jak: system zarządzania bezpieczeństwem jakości według normy ISO 22000, zarządzania jakością według normy ISO 9001, zintegrowane systemy zarządzania jakością (ZSZJ), zakładowe systemy zarządzania jakością oraz standardy British Retail Consortium (BRC) i International Food Standard (IFS) (Laming 2005, Morkis, 2012). Aktualnie, przedsiębiorstwa aspirujące do wprowadzania swoich wyrobów żywnościowych na rynki europejskie, w większości przypadków zmuszone są do legitymowania się certyfikatami

systemów zarządzania jakością, a niejednokrotnie strategiczni klienci narzucają dodatkowo własne standardy. Wymagania te spowodowały znaczący wzrost bezpieczeństwa żywności w Polsce w ostatnich latach, co przekłada się na zaufanie Państw członkowskich, dla których Polska jest partnerem handlowym. Nie oznacza to jednak, że na żywność produkowaną w Polsce nie wpływają skargi czy reklamacje. W roku 2022, NIK (Najwyższa Izba Kontroli) alarmowała o wzrastającej liczbie alertów z systemu RASFF (z ang. *Rapid Alert System for Food and Feed*) dotyczących żywności pochodzącej w Polski (Kontrola i audyt, 2022). Analiza dostępnych danych wskazuje, że ostrzeżenia te nie są bezpodstawne. Powołując się na raport RASFF (2022), w okresie ostatnich trzech lat najwięcej odnotowanych zgłoszeń do systemu dotyczyło żywności pochodzącej z Polski. Należy pamiętać, że duży wpływ miała na to skala produkcji żywności w naszym kraju, niemniej jest to niepokojąca tendencja, w której szczegóły i przyczyny warto się zagłębić.

Podsumowując, należy zwrócić uwagę na fakt, iż sektor przemysłu spożywczego w Polsce, a także w całej Europie jest rynkiem o stosunkowo dużej wartości. Oznacza, to że straty dotyczące poszczególnych gałęzi przemysłu spożywczego mogą powodować wymiennie wysokie szkody dla całej gospodarki kraju i regionu. Branża spożywcza ponosi szczególnie wysokie straty ze względu na zagrożenia mikrobiologiczne. W roku 2022 tendencja z ostatniej dekady nie uległa zmianie. Za niemal połowę rocznych zgłoszeń do systemu RASFF odpowiadały dwie kategorie ściśle związane z mikroorganizmami, tj.: mikroorganizmy patogenne oraz mykotoksyny. Warto pamiętać, że skażenie mikroorganizmami wykryte w żywności zazwyczaj wiąże się z dyskwalifikacją całej partii produkcyjnej, a co za tym idzie, również kosztami wycofania produktu z rynku. Skażona mikrobiologicznie żywność nie może być ponownie przetworzona ani wykorzystana, dlatego jedynym rozwiązaniem jest utylizacja, która zwykle generuje straty ekonomiczne i wizerunkowe dla producentów. Przy tak dużej wartości europejskiego i krajowego rynku żywności szczególną uwagę należy zwracać na kwestie związane z czystością i bezpieczeństwem mikrobiologicznym żywności (2022, Annual Report Alert i Cooperation Network).

1.2. Charakterystyka głównych zagrożeń w przemyśle spożywczym

Identyfikacja, znajomość oraz umiejętność kwalifikacji zagrożeń występujących w żywności są kluczową wiedzą, która pozwala na oferowanie konsumentom bezpiecznych produktów o odpowiedniej jakości. Podstawowymi zagrożeniami identyfikowanymi na etapach produkcji i obrotu żywności są zagrożenia fizyczne, chemiczne oraz zagrożenia biologiczne.

Zagrożenia fizyczne

Grupa zagrożeń fizycznych obejmuje ciała stałe, mogące dostać się nieoczekiwanie lub intencjonalnie do produktu. Substancjami wymienianymi najczęściej w literaturze tematu są: piasek, kamyki, opiłki metali, szkło, kości, części odzieży personelu produkcyjnego, biżuteria i włosy (Kołożyn-Krajewska i Sikora, 2010). Ciała obce klasyfikowane są na równi z zagrożeniami mikrobiologicznymi pod względem potencjalnego zagrożenia życia i zdrowia dla konsumenta, niemniej prewencja w walce z pojawieniem się ciał obcych jest zdecydowania prostsza, a kontrolery działające dzięki technologii rentgenowskiej X-ray pozwalają na wychwycenie i odrzucenie produktów zanieczyszczonych większością ciał obcych o dużej gęstości (Haff i Toyofuku, 2008).

Zagrożenia chemiczne

Drugą grupę zagrożeń stanowią te o charakterze chemicznym, które mogą powstawać na każdym etapie łańcucha żywnościowego. W grupie tej można wyróżnić:

- substancje toksyczne występujące naturalnie w surowcu;
- substancje powstające w wyniku procesów produkcji i hodowli;
- celowo dodawane substancje dozwolone, których poziom został przekroczony;
- pozostałości po procesach mycia i dezynfekcji;
- metale toksyczne; toksyny pochodzenia mikrobiologicznego;
- skażenia radioaktywne;
- środki dodawane w celu zafałszowania produktu.

Stosunkowo rzadko zdarza się, aby jednokrotne spożycie zanieczyszczonej chemicznie żywności wywołało objawy zatrucia. Dzieje się tak ze względu na fakt, iż pozostałości związków chemicznych są na ogół na tyle niewielkie, iż mieszczą się w limitach dopuszczonych przez akty prawne. Należy jednak pamiętać, że niektóre substancje, takie jak: pestycydy, metale ciężkie lub wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) mogą

kumulować się w organizmie, dając objawy zatrucia nawet po latach (Kołożyn-Krajewska i Sikora, 2010).

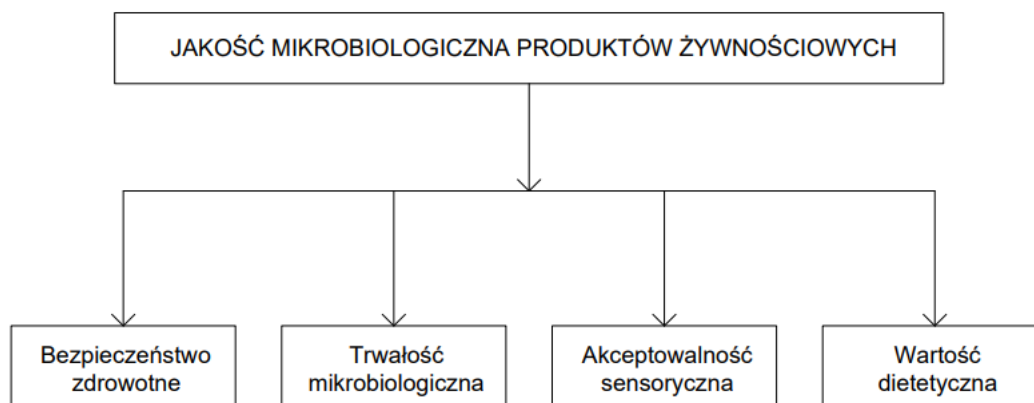
Zagrożenia biologiczne

Ostatnią, zwykle najszerzej opisywaną przez autorów opracowań, a jednocześnie najgroźniejszą dla zdrowia ludzi grupą zanieczyszczeń, są te o podłożu biologicznym, obejmujące mikroorganizmy, pasożyty i szkodniki. Choć kategoria ta zawiera w sobie pasożyty i szkodniki takie jak: roztocza, nicienie, owady i gryzonie, to pozbycie się ich poprzez procesy: mycia, dezynfekcji, dezynsekcji, deratyzacji czy podniesienia temperatury wydaje się być stosunkowo proste w porównaniu z eliminacją zagrożeń ze strony niewidocznych gołym okiem mikroorganizmów (Kołożyn-Krajewska i Sikora, 2010). Szkodniki (węgorek pszenicy, wołek zbożowy, mole i karaczany) przeważnie odpowiedzialne są za zniszczenia zapasów magazynowych. Groźniejsze dla zdrowia i życia ludzi są pasożyty takie jak tasieńce, glisty ludzkie czy włosienie kręte, bytujące głównie w przewodach pokarmowych zwierząt hodowlanych i ludzi. Źródłem transferu pasożytów jest zakażone mięso zwierząt spożywane przez ludzi lub rośliny uprawiane na polach nawożonych odchodami. Jednak to mikroorganizmy patogenne odpowiedzialne za psucie produktów spożywczych, zatrucia pokarmowe i choroby zakaźne będące wynikiem konsumpcji skażonej żywności, są uważane za najpoważniejsze zagrożenie dla zdrowia i życia ludzi (Schirone i in., 2017). W skład omawianej grupy mikroorganizmów zalicza się bakterie, grzyby i wirusy (Kołożyn-Krajewska i Sikora, 2010). Wirusy są bezwzględnyymi pasożytami wewnątrzkomórkowymi, które do rozmnażania i dalszej infekcji wymagają komórek gospodarza - żywiciela. Z tego względu zwykle nie są uznawane za organizmy żywe. Zewnątrzkomórkowa zakaźna cząstka zwana wirionem jest ze strukturalnego punktu widzenia bardzo prosta i składa się z: kwasu nukleinowego, jednoniciowego (ss) lub dwuniciowego (ds) i DNA lub RNA, otoczonego płaszczem białkowym. Ze względu na obecność lub brak otoczki lipidowej pochodzącej z błon komórkowych gospodarza i białek wirusowych, wirusy klasyfikuje się jako otoczone i nieotoczone. Na podstawie ich wielkości i kształtu, składu nukleotydów i struktury genomu, a także sposobu replikacji, wirusy dzieli się dalej na rodziny (King i in., 2012). Z punktu widzenia produkcji żywności najniebezpieczniejszymi wirusami są: *norowirus* oraz *hepatitis A*. Szacuje się, że jeden na pięć przypadków ostrego zapalenia jelit lub żołądka wywołane jest właśnie przez wspomniane wirusy (Bosch i in., 2018). Bakterie są najmniejszymi znanymi

istotami żywymi, należącymi do grupy organizmów jednokomórkowych (*Prokaryota*). Najmniejsze z nich mają rozmiary 0,15 - 0,2 μm . Z kolei grzyby występujące w żywności dzieli się na drożdże (jednokomórkowe) i pleśnie (grzyby strzępkowe), które są organizmami wielokomórkowymi (*Eucaryota*). Przeciętnie mają rozmiary 2 - 8 μm szerokości i do 10 μm długości (Kołożyn-Krajewska i Sikora, 2010).

Zagrożenia mikroorganizmami obecnymi w żywności można podzielić na dwie grupy. Pierwsza dotyczy drobnoustrojów saprofitycznych, które powodują pogorszenie cech produktów, często prowadząc do zepsucia się żywności. Drugą grupą są mikroorganizmy patogenne, które mogą wywoływać choroby, prowadzić do zatruc pokarmowych, a nawet śmierci osób spożywających skażoną żywność. Źródłem lub powodem zanieczyszczeń mikroorganizmami w przemyśle spożywczym są najczęściej: surowce użyte do produkcji, personel oraz infrastruktura zakładu produkcyjnego, dostęp i ruch świeżego powietrza oraz złe zarządzanie procesami: produkcyjnymi, magazynowymi oraz procesami mycia i dezynfekcji (Kołożyn-Krajewska i Sikora, 2010; Breza-Boruta i Szala, 2016). W niektórych gałęziach przemysłu, o ile to możliwe, drobnoustroje, które dostaną się do produktu w trakcie procesu produkcyjnego, mogą zostać inaktywowane w procesach takich jak np.: pasteryzacja, napromieniowanie czy suszenie. Należy jednak pamiętać, że toksyny wytwarzane przez mikroorganizmy patogenne bywają odporne na inaktywację wysoką temperaturą. Przykładem może być enterotoksyna gronkowcowa wytwarzana przez bakterie z gatunku *Staphylococcus aureus*, które mogą przetrwać procesy obróbki termicznej w żywności. (Podkowik, 2015). Oznacza to, że pomimo braku wykrywalności patogenów, w produkcie gotowym możemy mieć do czynienia z wyrobem niebezpiecznym, co jest spowodowane obecnością toksycznych metabolitów drobnoustrojów. Zatem, dla zapewnienia maksymalnego poziomu bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności, konieczne jest skupienie się na procesach prewencyjnych, mogących ograniczyć dostęp żywych komórek mikroorganizmów w obszarze produkcyjnym, głównie poprzez odpowiednią higienę oraz skuteczne procesy mycia i dezynfekcji (Wolf-Hall i Nganje, 2017). Drobnoustroje bytujące w żywności mają kompleksowy wpływ na wiele aspektów jakościowych żywności. Często obok terminu „bezpieczeństwo mikrobiologiczne” żywności pojawia się szersze zagadnienie „jakości mikrobiologicznej” żywności. Obejmuje ono zarówno aspekt bezpieczeństwa produktu, jak również aspekt jego trwałości mikrobiologicznej, akceptowalności sensorycznej oraz wartości dietetycznej (Kołożyn-

Krajewska i Sikora, 2010). Podejście to ma wiele zalet, ponieważ zakażenie mikroorganizmami może ujawnić się dopiero po pewnym czasie stopniowo wpływając na smak, teksturę czy konsystencję produktów spożywczych, jak również na zawartość makro i mikroelementów (Rysunek 1.1.).



Rysunek 1.1. Składowe jakości produktu żywnościowego bezpośrednio lub pośrednio wynikające z jego jakości mikrobiologicznej

źródło: opracowanie własne na podstawie (Kołożyn-Krajewska i Sikora, 2010)

Finalnie, jakość mikrobiologiczna końcowego wyrobu zależy od stopnia zanieczyszczenia surowca wykorzystanego do produkcji, potencjału rozwoju mikroorganizmów w trakcie przechowywania surowców oraz końcowego produktu oraz możliwości przedostania się ich do wyrobu w procesie przetwarzania i produkcji. Nie bez znaczenia jest także rodzaj mikroorganizmów, ich tempo i warunki wzrostu, a także dostępność składników odżywczych i tlenu. Znajomość granicznych warunków wzrostu poszczególnych drobnoustrojów może pomóc w zidentyfikowaniu problemu oraz podjęciu skutecznych działań zapobiegawczych. Do najważniejszych czynników wzrostu mikroorganizmów zaliczane są: temperatura, pH, aktywność wodna, wilgotność, dostępność tlenu, potencjał oksydacyjno-redukcyjny, zawartość i dostępność składników odżywczych oraz obecność innych związków chemicznych w otoczeniu wzrostu bakterii, mogących działać hamująco na wzrost mikrobów (np.: antybiotyki). Najważniejsze z czynników umieszczono, wraz z zakresami granicznymi wzrostu poszczególnych typów mikroorganizmów, w tabeli 1.1.

Tabela 1.1. Warunki graniczne wzrostu wybranych grup mikroorganizmów

Rodzaj mikroorganizmów	Czynniki											
Temperatura w °C												
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90		
Bakterie termofilne												
Bakterie mezofilne												
Bakterie psychrofilne												
Grzyby pleśniowe												
Aktywność wodna												
	1		0,9		0,8		0,7					
Bakterie												
Drożdże												
Grzyby pleśniowe												
pH												
	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1		
Bakterie												
Grzyby pleśniowe i drożdże												
% zawartości tlenu												
	100		80		60		40		20		0	
Aeroby												
Względne anaeroby												
Mikroaerofile												
Anaeroby												

źródło: opracowanie własne na podstawie (Kołożyn-Krajewska i Sikora, 2010)

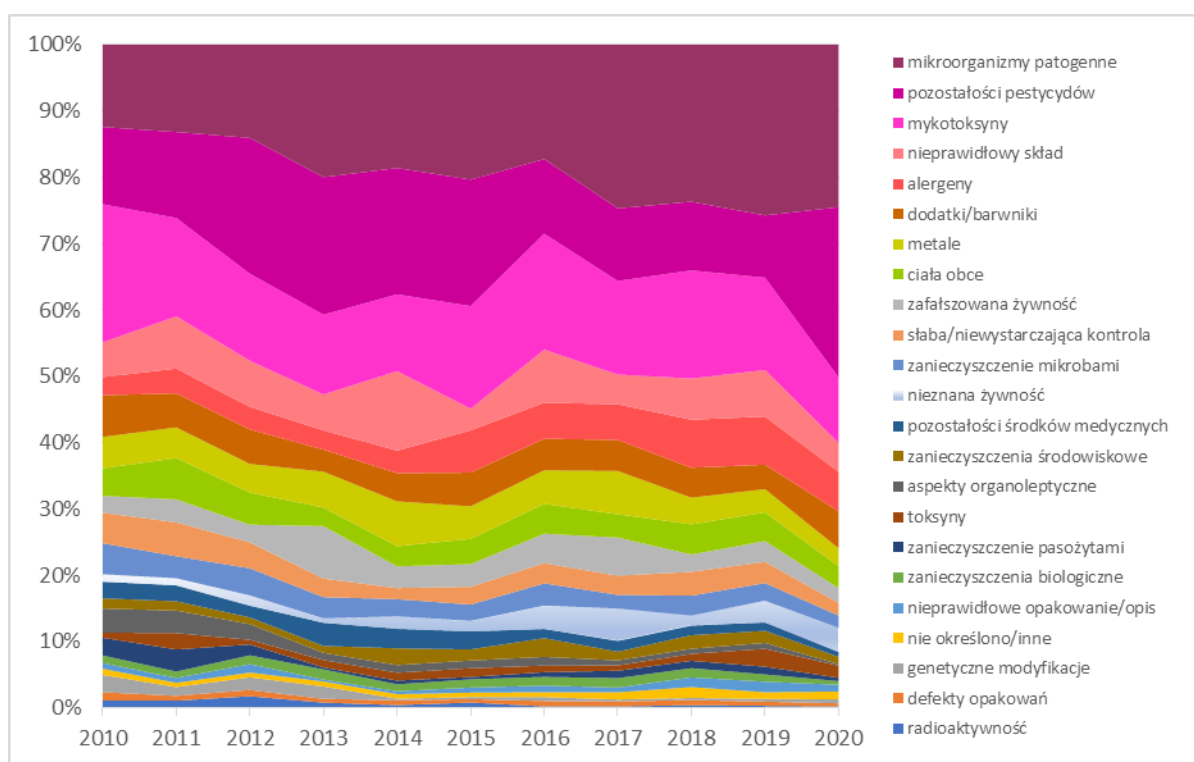
Producenci żywności, w dzisiejszych realiach rynkowych, muszą mieć na uwadze przede wszystkim bezpieczeństwo konsumentów. Każdy wykryty przez konsumenta defekt, niedoskonałość lub, w skrajnych przypadkach, zatrucie spożytą żywnością prowadzi w konsekwencji do olbrzymich strat finansowych i wizerunkowych. Zapewnienie należytego stopnia bezpieczeństwa wymaga znajomości zagrożeń, przed którymi staje każda z branż. Analiza ryzyka w obszarze wspomnianych wcześniej czynników fizycznych, chemicznych i biologicznych jest jednym z początkowych etapów precyzyjnie budowanego systemu zapewnienia bezpieczeństwa żywności w zakładach przemysłowych. W dalszej części pracy zaprezentowano analizę najczęstszych czynników powodujących dyskwalifikację produktów spożywczych na terenie Europy, powołując się na dane z systemu RASFF.

1.3. Analiza zagrożeń bezpieczeństwa żywności według systemu RASFF

Odpowiadając na potrzeby szybkiego reagowania i zapewnienia bezpieczeństwa żywności, w ramach każdej ze wspomnianych grup zagrożeń (fizycznych, chemicznych, biologicznych), powołano System Wczesnego Ostrzegania o Niebezpiecznej Żywności i Paszach – RASFF.

System ten obliguje kraje członkowskie Unii Europejskiej do powiadamiania pozostałych państw członkowskich o produktach, w których wykryto zagrożenie dla zdrowia. Powiadomienie zawiera szczegółowe informacje dotyczące samego produktu oraz deklarację, jakie działania zostały podjęte w celu wyeliminowania zagrożenia. Szybka reakcja oraz udostępnienie informacji pozwalających zidentyfikować i wyśledzić produkt pozwala na skuteczne kontrolowanie kryzysowych sytuacji, takich jak potrzeba poinformowania opinii publicznej lub pilne wycofanie produktu z rynku.

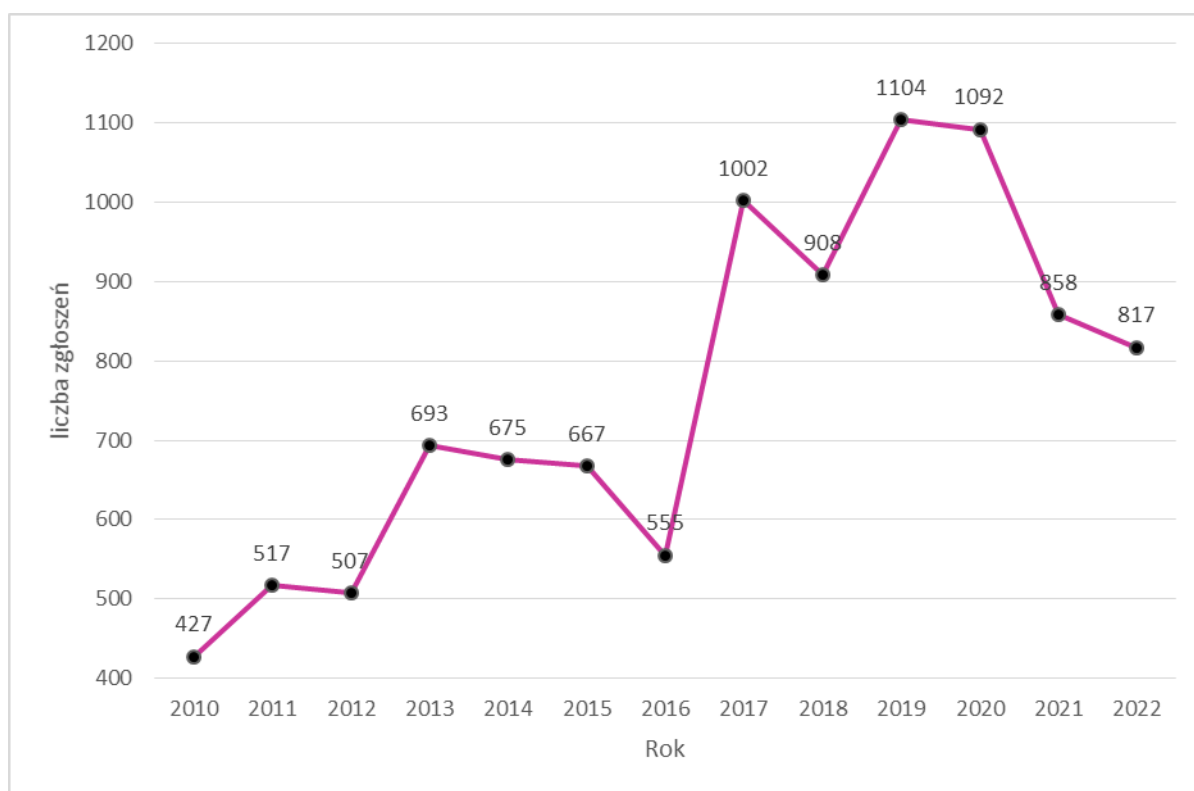
Analiza zgłoszeń do systemu RASFF daje możliwość wyciągania wniosków na podstawie danych historycznych, pozwala zobrazować profil najczęstszych problemów, z którymi borykają się zakłady produkujące żywność w Unii Europejskiej, a co za tym idzie – skuteczniej im przeciwdziałać. Przywołując dane podsumowujące minioną dekadę (2010-2022), przedstawione na wykresie 1.1., warto zauważyć, że blisko 50% wszystkich zgłoszeń dotyczących żywności skupia się w trzech głównych kategoriach: mikroorganizmy patogenne, pozostałości pestycydów i mykotoksyny (łącznie w systemie przewidziano 29 kategorii, co znacznie rozbudowuje tradycyjne podejście z podziałem na trzy grupy).



Wykres 1.1. Procentowy rozkład zgłoszeń do systemu RASFF w latach 2010 – 2020 według kategorii zagrożenia

Źródło: opracowanie własne na podstawie danych z systemu RASFF

Powyższe podsumowanie w formie wykresu warstwowego jasno wskazuje, iż największe zagrożenie w żywności spowodowane jest przez mikroorganizmy. Blisko jedna piąta wszystkich zagrożeń dotyczy mikroorganizmów patogennych, natomiast trzecia co do liczebności kategoria, czyli mykotoksyny, to metabolity grzybów strzępkowych, zatem pochodzenie zagrożenia jest w obydwu przypadkach tożsame. Wskazuje to na główny obszar, w obrębie którego skupienie uwagi i wysiłków mogłoby dać najbardziej wymierne efekty. Jest to kierunek konieczny, tym bardziej, że rozpatrując dane rok do roku, procentowy udział zanieczyszczeń mikroorganizmami patogennymi wzrasta pomimo licznych kontroli oraz coraz bardziej restrykcyjnych norm międzynarodowych i branżowych. Zanieczyszczenia żywności mikroorganizmami chorobotwórczymi stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia i życia konsumentów, jak również przyczyniają się do znaczących strat ekonomicznych przedsiębiorstw spożywczych.



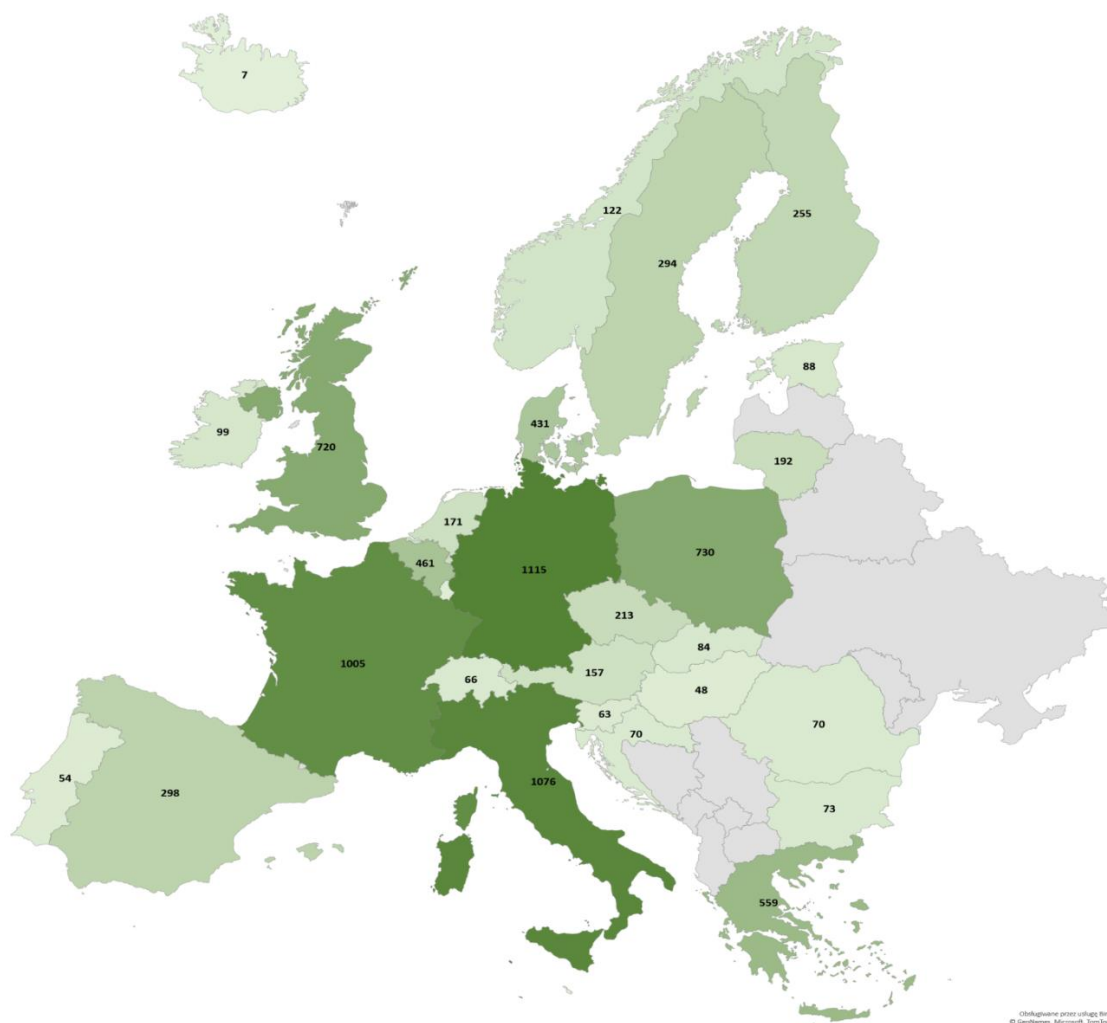
Wykres 1.2. Liczba zgłoszeń do systemu RASFF w latach 2010-2022 w sekcji zagrożeń patogennymi mikroorganizmami*

* Liczba zgłoszeń została zawężona do żywności przeznaczonej do spożycia przez ludzi, nie rozpatrywano natomiast pasz

Źródło: opracowanie własne na podstawie danych z systemu RASFF

Nadzieję na poprawę sytuacji dają dane za minione dwa lata – 2021 i 2022r. Powołując się na wykres 1.2., bezwzględna liczba zgłoszeń dotyczących omawianej kategorii spadła względem roku 2019 i 2020. Trudno jednoznacznie stwierdzić, czy ma to związek z większą dbałością o bezpieczeństwo mikrobiologiczne żywności w łańcuchu produkcji i dostaw, czy też są to anomalne obserwacje związane z wpływem pandemii COVID-19, zarówno na zwiększoną higienę w każdym obszarze funkcjonowania ludzi, jak i na zmiany rynku żywności. Niezależnie od spadku liczby zgłoszeń w ostatnich dwóch latach, nadal to patogenne mikroorganizmy stanowiły najliczniejszą grupę powodującą zanieczyszczenia żywności.

System RASFF daje wskazówkę nie tylko przeciwko jakiej kategorii zagrożeń należy podejmować najbardziej zdecydowane kroki, ale również w których krajach dochodzi do najczęstszych zaniedbań w produkcji żywności. Na podstawie dostępnych danych stworzono kartogramy (wykres 1.3. i wykres 1.4.) dla liczebności zgłoszeń pochodzących z krajów Unii Europejskiej oraz krajów członkowskich systemu RASFF, związanych z obecnością patogennych mikroorganizmów w żywności. Z danych przedstawionych na wykresie 1.3 wynika, że państwami najczęściej zgłaszającymi problem z bakteriami wykrytymi w produktach spożywczych są odpowiednio: Niemcy (1115 zgłoszeń), Włochy (1076 zgłoszeń) i Francja (1005 zgłoszeń). Polska znajdowała się na czwartym miejscu, zgłaszając w ciągu ostatnich 10 lat 720 przypadków wykrytego zagrożenia. Wyniki te mogą wskazywać na fakt dokładniejszych kontroli w wymienionych krajach, dzięki czemu konsumenci mogą czuć się bezpieczniej. Nie bez wpływu jest też sama ilość importowanej przez wymienione państwa żywności. Niemcy i Francja plasowały się w roku 2021 odpowiednio na pierwszym i trzecim miejscu (Żywność w Polsce- Raport, 2022).

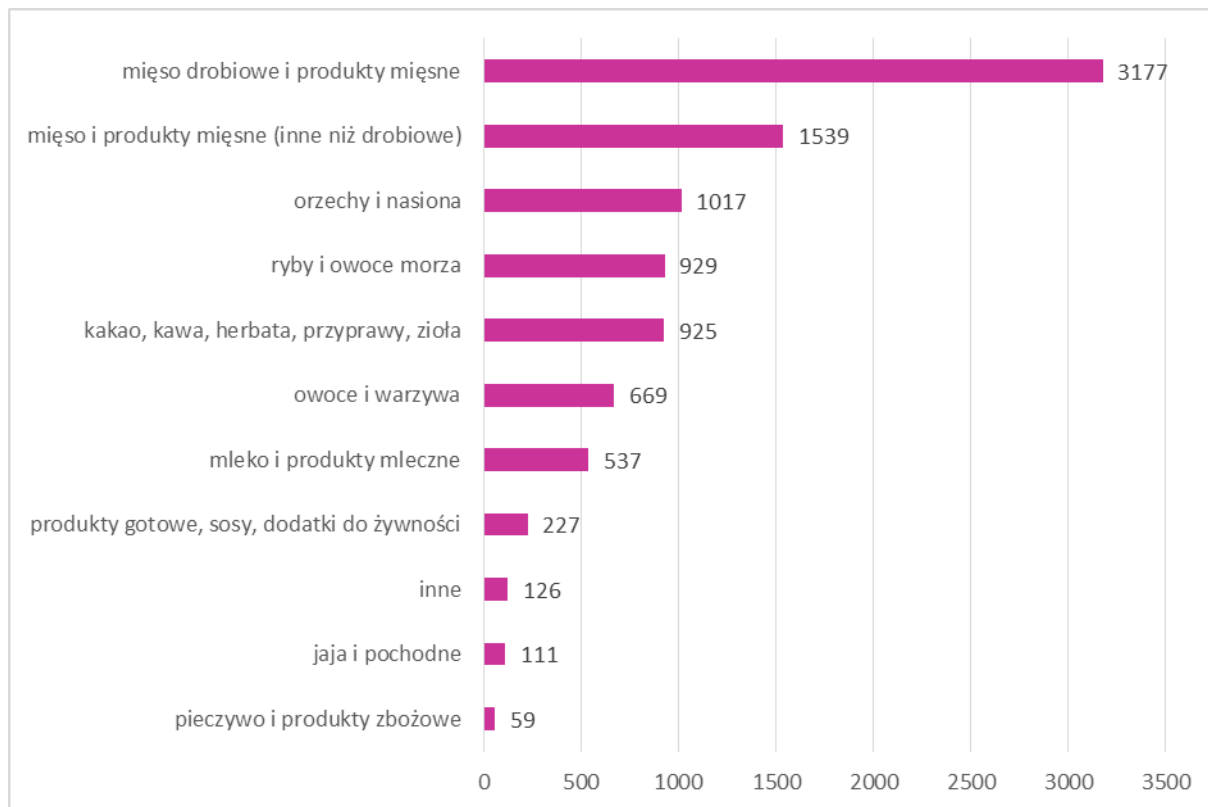


Wykres 1.3. Liczba zgłoszeń do systemu RASFF w latach 2010-2022 w podziale na kraje członkowskie zgłaszające wykryte nieprawidłowości

Źródło: opracowanie własne na podstawie danych z systemu RASFF

Zapewnienie bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności jest jednym z głównych wyzwań ostatnich lat, przed którymi stoją organy regulacyjne, służby kontrolne oraz producenci żywności. Dane na wykresie 1.4 pokazują, że w latach 2010-2022 to właśnie względem żywności produkowanej w Polsce zgłoszono najwięcej alertów w ujęciu globalnym (1709 zgłoszeń). Na kolejnych miejscach znajdowały się: Brazylia (1171 zgłoszeń) oraz Francja (875 zgłoszeń).

Jak wskazano w dalszej części analizy (wykres 1.5), rozpatrując zagrożenia w przemyśle spożywczym jeszcze bardziej szczegółowo, za przeważającą część wszystkich zgłoszeń odpowiadają bakterie z rodzaju *Salmonella* sp., występujące przede wszystkim w przemyśle mięsnym, a dokładniej w przemyśle drobiarskim.



Wykres 1.5. liczba zgłoszeń do systemu RASFF w kategorii zagrożeń patogennymi mikroorganizmami w podziale na produkty, w latach 2010-2022

Źródło: opracowanie własne na podstawie danych z systemu RASFF

Taki rozkład zgłoszeń tłumaczyłby występowanie Polski i Brazylii na dwóch pierwszych miejscach (wykres 1.4.), ponieważ to właśnie te kraje odpowiedzialne są za największą produkcję drobiu odpowiednio w Europie i Ameryce Południowej. Niemniej jednak, nie można tłumaczyć tak poważnych zagrożeń jedynie skalą produkcji. Jeśli branża spożywcza w Polsce ma się rozwijać zgodnie z prognozami, niezbędne jest pełne zaufanie partnerów handlowych, natomiast aby to osiągnąć należy zwrócić szczególną uwagę na poprawę bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności.

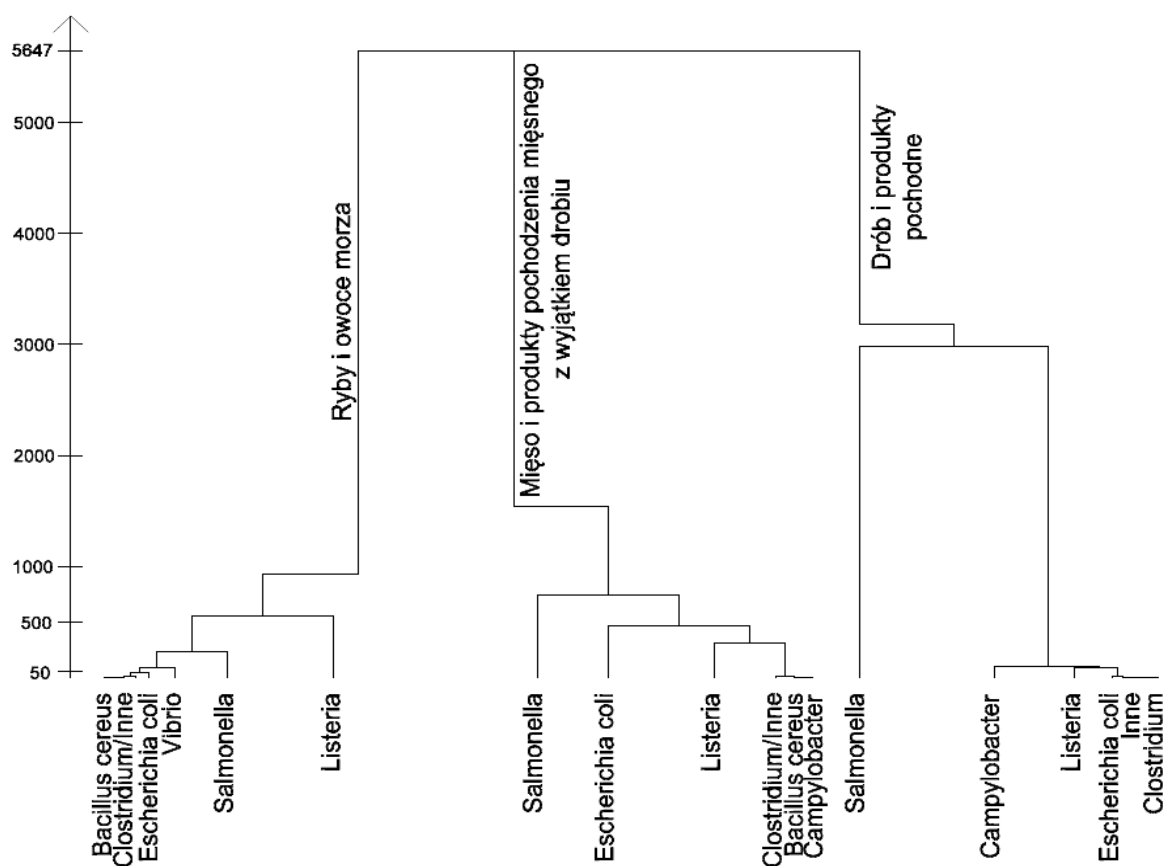
1.4. Najczęściej występujące zagrożenia mikrobiologiczne w przemyśle spożywczym według systemu RASFF

Mikroorganizmy występujące w każdej gałęzi przemysłu spożywczego mogą przedostawać się do produktów spożywczych i obniżać ich jakość. Szczególnie niebezpieczne są zanieczyszczenia bakteriami odpowiedzialnymi za choroby przenoszone przez żywność, które w zależności od gatunku i szczepu mikroorganizmu mogą prowadzić do ostrych zatruc pokarmowych, krwotocznego zapalenia żołądka i jelit, posocznicy lub infekcji ogólnoustrojowych, a w konsekwencji nawet do śmierci osób, które spożyły skażoną żywność (Zhao i in., 2017). Do patogennych bakterii najczęściej przenoszonych przez żywność należą: *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*, enterokrwotoczne i enterotoksyczne szczepy *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* oraz w mniejszym stopniu *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Cronobacter* spp., *Pseudomonas* spp. (ECDC i EFSA, 2018) , WHO, 2015, RASFF, 2022). Według raportów WHO, choroby bakteryjne przenoszone przez żywność, pomimo wdrożenia licznych systemów kontroli jakości i bezpieczeństwa żywności (m.in.: dobrych praktyk produkcyjnych i higienicznych GHP i GMP, systemu HACCP, restrykcyjnych systemów ISO serii 22000), są nadal istotnym problemem zdrowia publicznego zarówno w krajach rozwiniętych, jak i rozwijających się (WHO, 2015). Dane RASFF (wykres 1.5.) wskazują, że najwięcej zgłoszeń w kategorii zanieczyszczenia żywności mikroorganizmami patogennymi dotyczyło sektora produkcji mięsa drobiowego, stanowiąc 3177 odnotowanych zawiadomień składających się na jedną trzecią wszystkich alertów w rozpatrywanym okresie. Drugim sektorem pod względem liczebności była produkcja mięsa innego niż drobiowe (1539 zgłoszeń), które wraz z mięsem drobiowym składało się na ponad połowę wszystkich zgłoszeń. Na dalszych miejscach odnotowano sektory produkcji: orzechów i nasion, ryb i owoców morza oraz suchych produktów takich jak: kawa, herbata, zioła i przyprawy (odpowiednio: 1017, 929 oraz 925 zgłoszeń).

Ograniczenie przypadków zanieczyszczenia żywności patogennymi mikroorganizmami wymaga odpowiedniej strategii, do której zbudowania niezbędna jest wiedza na temat mikroorganizmów typowych dla danego przemysłu. Mikroorganizmy mają swoje preferencje dotyczące środowiska występowania, substancji odżywczych i warunków do życia. Różnią się zdolnością adhezji do podłoża, a także wrażliwością na poszczególne związki chemiczne

używane w procesach mycia i dezynfekcji. Niektóre rodzaje zdolne są do wytwarzania przetrwalników – form opornych, zdolnych do przetrwania ekstremalnych warunków, inne z kolei posiadają zdolność formowania biofilmu czyli wielokomórkowych struktur, w obrębie których mikroorganizmy mogą się komunikować i wymieniać geny oporności na substancje aktywne zawarte w środkach dezynfekujących (Yuan i in., 2020). Dlatego właśnie kluczowa jest znajomość najczęściej występujących mikroorganizmów w poszczególnych gałęziach przemysłu spożywczego.

Z wykorzystaniem danych systemu RASFF w niniejszej pracy stworzono dendrogramy przedstawiające liczbę zgłoszeń dotyczących konkretnych patogenów w poszczególnych branżach, mogących stanowić odpowiedź dotyczącą występowania w nich konkretnych mikroorganizmów. Wykresy pogrupowano tematycznie. Na wykresie 1.6. połączono branże produkcji mięsa, w tym mięsa drobiowego jak i pozostałych rodzajów, a także ryby i owoce morza.



Wykres 1.6. Zgłoszenia zagrożeń mikrobiologicznych w produkcji mięsnej w latach 2010 - 2022

Źródło: opracowanie własne na podstawie danych z systemu RASFF

łącznie trzy wspomniane gałęzie przemysłu stanowiły ponad 60% wszystkich zgłoszeń dotyczących zanieczyszczenia żywności przez patogeny lub ich toksyny (5647 zgłoszeń). Są to zatem branże, w obrębie których należy zwrócić szczególną uwagę na czystość mikrobiologiczną, odpowiednie zarządzanie bezpieczeństwem żywności oraz skuteczność procesów mycia i dezynfekcji.

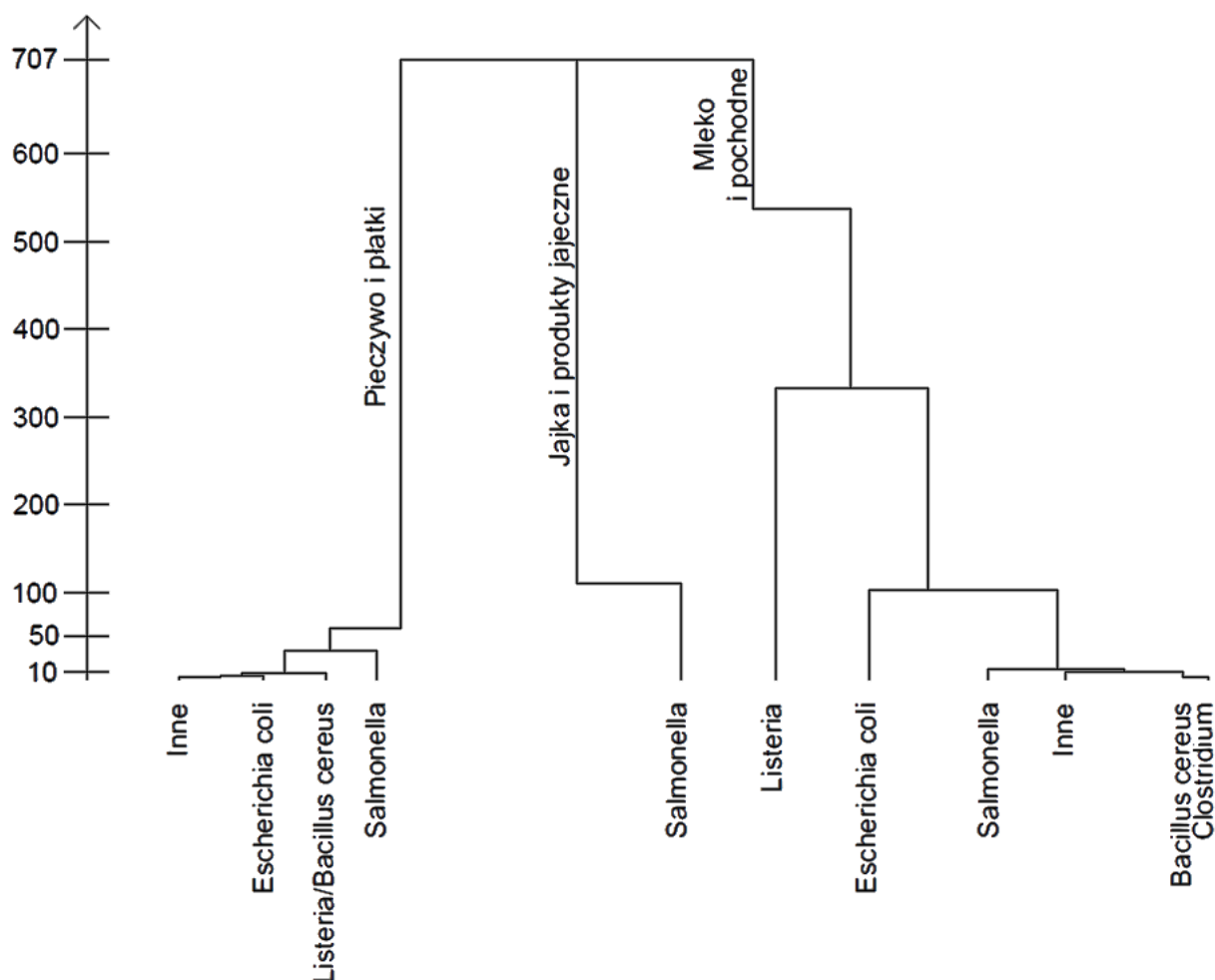
W przypadku mięsa najczęstszą przyczyną zgłoszenia były bakterie z rodzaju *Salmonella* (odpowiednio: 2977 i 744 zgłoszenia). Bakterie należące do rodzaju *Salmonella* są względnie beztlenowymi, Gram-ujemnymi pałeczkami. Spośród wszystkich bakterii z tego rodzaju, ponad 99% chorób wśród ludzi wywoływanych jest przez gatunek *Salmonella enterica* (Chen i in., 2013, EFSA, 2018). W kontekście zagrożeń w przemyśle spożywczym najważniejsze są dwa typy serologiczne tego drobnoustroju – *Salmonella enterica* ser. Enteritidis (przenoszona głównie przez drób) i *Salmonella enterica* ser. Typhimurium (przenoszona również przez świnie i bydło) (Antunes i in., 2016). Salmonelloza, którą wywołują opisywane bakterie, powoduje zespoły zapalenia żołądka i jelit, których objawami pojawiającymi się po 4-72 godzinach są: biegunka, gorączka i bóle brzucha (Chen i in., 2013). Drobnoustroje z rodzaju *Salmonella* tworzą biofilm na większości abiotycznych powierzchni używanych w przemyśle spożywczym oraz, co istotne, z łatwością przyczepiają się do mięsa lub innych produktów, zwiększając ryzyko krzyżowych zakażeń poza zakładem przetwórstwa żywności (Wang i in., 2013). De Oliveira (2014) wykazał, że ponad 98% izolatów *Salmonella* sp. pochodzących z mięsa drobiu, użytych do badań, wytwarzało biofilm na przynajmniej jednej z badanych powierzchni (tworzywo sztuczne, guma, cement, szkło) w zakresie temperatur od 16 do 35°C. Bakterie z rodzaju *Salmonella* wykorzystują fimbrie w celu adhezji do podłoża, następnie tworzą macierz złożoną głównie z celulozy. Budowany biofilm ma strukturę wielowarstwową, która pozwala przetrwać żyjącym w nim bakteriom do roku, nawet w warunkach niskiej aktywności wodnej (Galié i in., 2018). Najnowsze badania *in vitro* dotyczące unieszkodliwiania biofilmu tych bakterii wskazują, iż środki dezynfekujące używane w przemyśle spożywczym powodują nadekspresję genów odpowiedzialnych za zjadliwość i zdolność tworzenia biofilmu, stąd ważne jest poszukiwanie nowych sposobów kontroli tego zagrożenia, w szczególności w przemyśle mięsnym (Romeu i in., 2020).

W przemyśle mięsnym innym niż przemysł drobiarski, a także przemyśle mlecznym (wykresy 1.6 i 1.7.) poważnym zagrożeniem są także bakterie z gatunku *Escherichia coli* (462 zgłoszenia). *E. coli* to, podobnie jak *S. enterica*, Gram-ujemna, względnie beztlenowa

bakteria. W przeciwieństwie jednak do bakterii z rodzaju *Salmonella* większość szczepów *E. coli* jest naturalną częścią mikrobioty jelita grubego człowieka oraz zwierząt stałocieplnych. Przenoszone przez żywność są oznaką jej złej jakości, skażenia związanego przeważnie z brakiem higieny i mogą być niebezpieczne dla zdrowia i życia konsumentów. Szczepy *E. coli*, które uważane są za bezwzględnie niebezpieczne dla zdrowia i życia ludzi to szczepy enterotoksyczne i enterokrwotoczne (Galié i in., 2018). Najbardziej niebezpieczne w kontekście przemysłu spożywczego są szczepy produkujące toksynę Shiga (najczęściej identyfikowany serotyp to O157:H7) (Karch i in., 1999). Już stosunkowo niewielka liczba, około 50 komórek *E. coli* STEC (z ang. *Shiga toxin-producing E. coli*) - wywołuje zaburzenia funkcjonowania układu pokarmowego mogące prowadzić do biegunek, a w ciężkich przypadkach do krwotocznego zapalenia jelit (Karch i in., 1999). Galié i inni (2018) wskazują przy tej okazji na szczególne zagrożenie wytwarzanym przez te bakterie biofilmem, bowiem nawet niewielka jego część, przedostając się do żywności, może mieć poważne konsekwencje dla zdrowia konsumenta. Dodatkowym niebezpieczeństwem jest fakt, iż bakterie STEC żyjące w biofilmie są wysoce odporne, w porównaniu z innymi bakteriami z rodzaju *Escherichia*, na działanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego oraz popularnych w przemyśle spożywczym środków do dezynfekcji (Chagnot i in., 2014). Tworząc biofilm, komórki bakterii STEC przyczepiają się do powierzchni zarówno biotycznych jak i abiotycznych wykorzystując flagelle i fimbrie (Carter i in., 2016). Siła adhezji, już na początkowym etapie formowania się biofilmu, jest na tyle duża, że procesy mycia, na przykład warzyw, nie usuwają komórek z ich powierzchni (Silagyi i in., 2009).

Znacznie mniejszą liczbę przypadków zakażenia żywności odnotowano z udziałem bakterii *Campylobacter jejuni*. W większym stopniu zanieczyszczenie tym mikroorganizmem występowało jedynie w przemyśle drobiarskim (104 zgłoszenia), dla którego jest bardzo charakterystyczna. *C. jejuni* to Gram-ujemna, mikroaerofilna bakteria często wywołująca zatrucia pokarmowe u ludzi. Oprócz infekcji żołądkowo-jelitowych, w niektórych przypadkach, *C. jejuni* może powodować rozwój zespołu Guillaina-Barrégo, czyli zaburzenia autoimmunologicznego obwodowego układu nerwowego (Oh, Ireus i Jeon, 2018). Patogen ten nie jest znany z efektywnego tworzenia biofilmu bakteryjnego. Jak wskazują badania, aby mikroorganizm ten skutecznie mógł skolonizować środowisko produkcyjne, niezbędna jest wcześniejsza obecność innych, szybciej tworzących biofilm mikroorganizmów, takich jak *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp. czy *E. coli* (Teh, Lee i Dykes, 2019). Niedopuszczanie do

powstania biofilmu poprzez starannie wykonywane procesy mycia i dezynfekcji są w przypadku *C. jejuni* najskuteczniejszym sposobem eliminacji bakterii z obszarów produkcji żywności.



Wykres 1.7. Zgłoszenia zagrożeń mikrobiologicznych w produkcji mleczarskiej, piekarniczej oraz produkcji jaj w latach 2010 - 2022

Źródło: opracowanie własne na podstawie danych z systemu RASFF

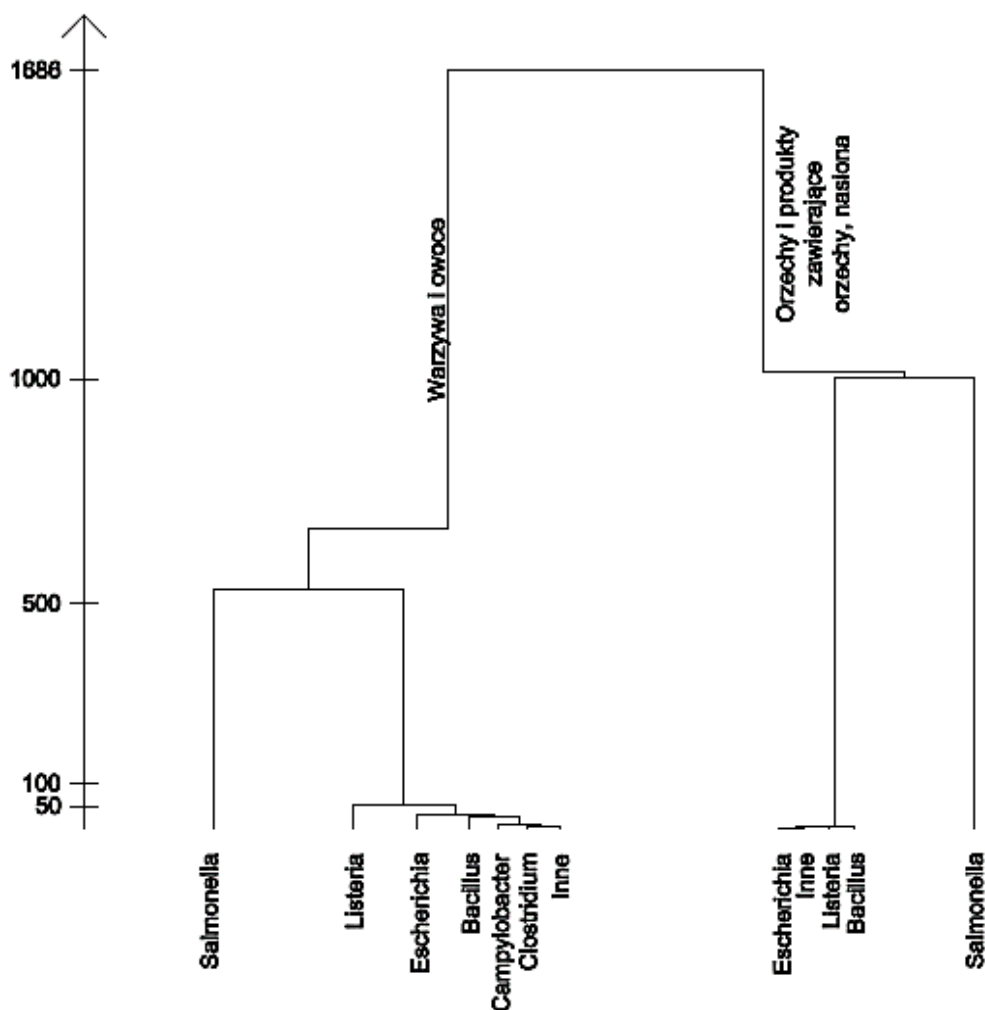
Przemysł rybny i branża owoców morza (557 zgłoszeń), a także szeroko pojęty sektor mleczarski (333 zgłoszenia, co stanowiło blisko 50% wszystkich odnotowanych w sektorze – wykres 1.7.) najczęściej spotykają się natomiast z zagrożeniem związanym z obecnością bakterii z gatunku *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* to powszechnie występująca w środowisku, względnie tlenowa pałeczka Gram-dodatnia, zdolna do wzrostu w szerokim zakresie temperatur (1 do 45°C) i pH (4 do 9), co czyni ją szczególnie niebezpieczną dla żywności przechowywanej w warunkach chłodniczych z wykorzystaniem lodu (Mørretrø i Langsrud, 2004). Spożycie żywności skażonej przez bakterie *L. monocytogenes* może

prowadzić do listeriozy, szczególnie niebezpiecznej dla noworodków, kobiet w ciąży i osób starszych. Częstość występowania listeriozy jest zdecydowanie niższa niż w przypadku innych chorób bakteryjnych, niemniej choroba ta charakteryzuje się wysokim współczynnikiem śmiertelności (Camargo i in., 2017). W warunkach produkcyjnych *L. monocytogenes* może przetrwać miesiące, a nawet lata. Jej siedliskiem są przede wszystkim powierzchnie i elementy wyposażenia zakładu produkcyjnego. Wynika to głównie ze zdolności bakterii do przetrwania w warunkach ekstremalnych takich jak: mała ilość substancji odżywczych, temperatury chłodnicze, wysoka zawartość soli, niska aktywność wodna oraz z uwagi na zdolność efektywnego formowania biofilmu bakteryjnego (Rodríguez-López i in., 2018).

Wykres 1.7. pokazuje również, że w produktach pochodzących od jaj kurzych oraz w przypadku samych jaj zgłoszenia zawsze dotyczą bakterii z rodzaju *Salmonella* sp. W przemyśle piekarniczym natomiast bakterie *Salmonella* sp. odpowiadają za największą liczbę zgłoszeń, wyprzedzając liczbę zgłoszeń dotyczących bakterii *L. monocytogenes*, *E. coli* i *B. cereus*.

Ostatni z wymienionych mikroorganizmów, *B. cereus*, jest szczególnie warty uwagi ze względu na umiejętność wytwarzania form przetrwalnikowych. Ruchliwa, tlenowa, mezofilna, Gram-dodatnia pałeczka bardzo szybko wytwarza struktury wydłużonych zarodników odpornych na ekstremalne warunki środowiskowe takie jak ogrzewanie, zamrażanie, suszenie i promieniowanie ultrafioletowe. Ze względu na zdolność przetrwalnikowania, bakteria ta zdolna jest przetrwać warunki pasteryzacji (Kotiranta, 2020). *B. cereus* izolowany jest głównie z produktów mięsnych i ryżu, rzadziej występuje w produktach mlecznych. Objawami zatrucia pokarmowego wywołanego przez ten patogen mogą być biegunka i wymioty. Pomimo zdolności wytwarzania przetrwalników *B. cereus* nie stanowi tak dużego zagrożenia w przemyśle spożywczym jak bakterie *Salmonella* sp. czy *L. monocytogenes*, czego jedną z głównych przyczyn może być brak zdolności efektywnego tworzenia biofilmu.

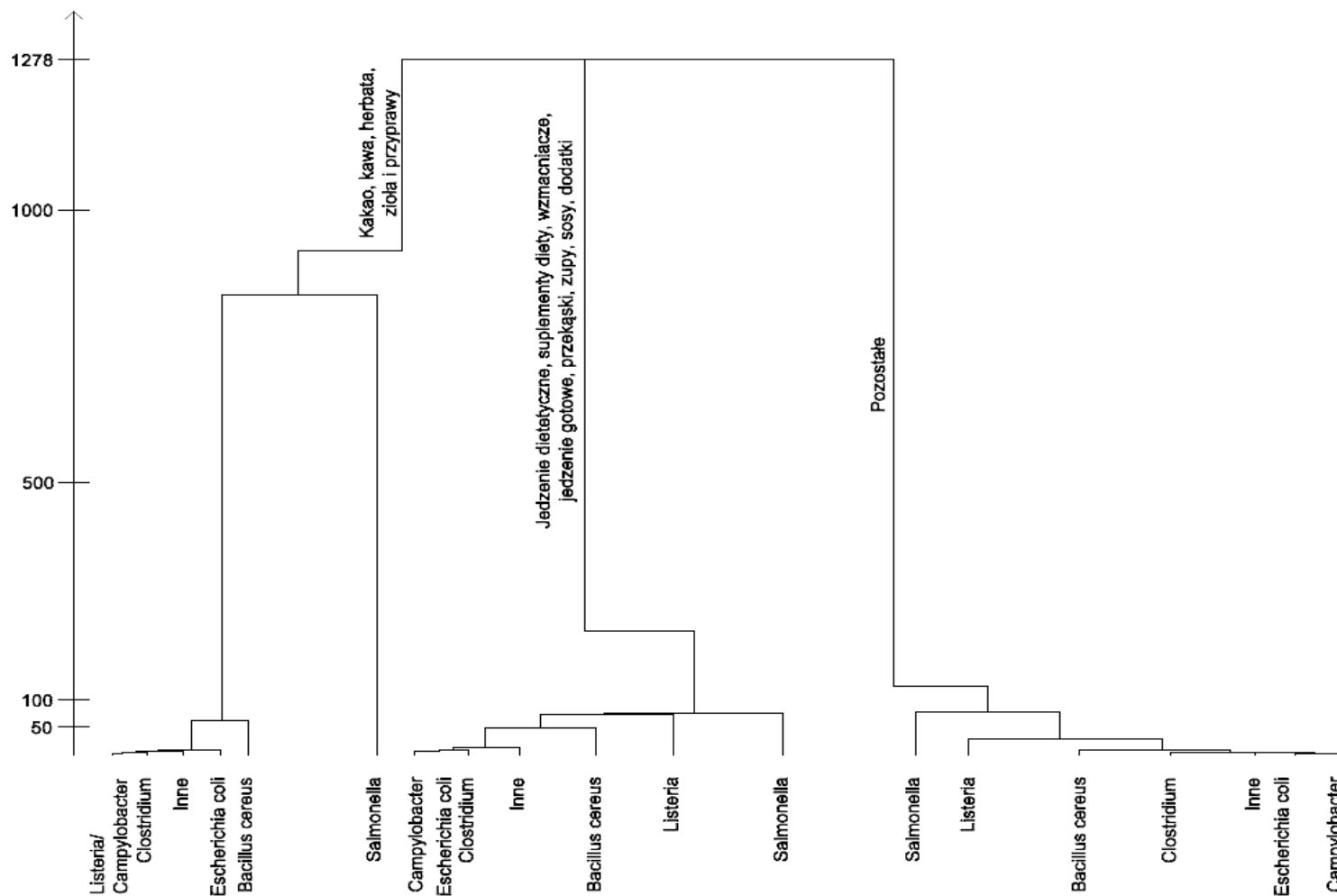
W przypadku przetwórstwa owoców i warzyw (wykres 1.8.) najczęściej występującym patogenem, tak jak w większości przypadków, były bakterie z rodzaju *Salmonella* (531 przypadków spośród 669 zgłoszeń), następnie *Listeria* (55) i *Escherichia* (32). Zgłoszenia dotyczące produktów takich jak orzechy i nasiona zostały natomiast całkowicie zdominowane przez bakterie wywołujące salmonellozę (1005 przypadków spośród 1017).



Wykres 1.8. Zgłoszenia zagrożeń mikrobiologicznych w przetwórstwie owocowo-warzynym, upraw produkcji nasion i orzechów w latach 2010 – 2022

Źródło: opracowanie własne na podstawie danych z systemu RASFF

Ostatnim obszarem, w którym zgłaszano znaczącą liczbę alertów były gałęzie przemysłu produkującego suche produkty takie jak: kakao, kawa, herbata, zioła i przyprawy (wykres 1.9.). Odnotowano 925 przypadków zaniedbań, z czego ponad 90% dotyczyło bakterii z rodzaju *Salmonella*. Drugą grupą pod względem liczebności były zgłoszenia dotyczące bakterii *B. cereus* (63 przypadki), natomiast inne przypadki stanowiły poniżej 1% wszystkich zgłoszeń w sektorze. Pozostałe dwie gałęzie zaprezentowane na wykresie 1.9. tj.: produkty gotowe do spożycia, sosy, dodatki do żywności, barwniki spożywcze, suplementy diety,



Wykres 1.9. Zgłoszenia zagrożeń mikrobiologicznych w produkcji kawy, herbaty, ziół i przypraw; żywności specjalnego przeznaczenia oraz dań gotowych, a także produktów pozostałych, niezawartych w innych gałęziach, w latach 2010 – 2022

Źródło: opracowanie własne na podstawie danych z systemu RASFF

żywność dietetyczna specjalnego przeznaczenia, żywność dla niemowląt, zupy oraz pozostałe produkty spożywcze nieujęte w innych kategoriach stanowiły razem grupę 353 przypadków spośród 9316 odnotowanych przez system RASFF w latach 2010-2022 w kategorii zanieczyszczeń przez mikroorganizmy patogenne lub ich toksyny.

Warto wspomnieć, że niektóre infekcje mikroorganizmami patogennymi są ściśle związane z występowaniem zjawiska biofilmu (Zhao i in., 2017). Bakterie tworzące biofilm są szczególnie niebezpieczne w obszarze produkcji żywności i wykazują zwiększoną odporność na środki dezynfekujące (Yuan i in., 2020). Biofilmem nazywane jest zorganizowane skupisko zagregowanych, żywych komórek mikroorganizmów, osadzonych w samodzielnie wytworzonej matrycy złożonej z zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych (EPS – z ang. *extracellular polymeric substances*). W skład biofilmu, wraz z żywymi komórkami oraz EPS, wchodzi również: bakteriocyny, komórki eukariotyczne, enzymy oraz w 90-97% woda. Struktura biofilmu osiąga od kilkunastu mikrometrów do nawet kilku milimetrów grubości, tworząc w naturalnych warunkach stabilny rezerwuuar dla mieszanych szczepów mikroorganizmów (Brooks i Flint 2008, Rabin i in., 2015).

Niepożądane mikroorganizmy mogą zanieczyszczać produkt spożywczy poprzez bezpośredni kontakt biofilmu z produktem, jak również pośrednio. Dzieje się tak, gdy podczas procesów czyszczenia i dezynfekcji część biofilmu zostaje oderwana od powierzchni niemającej kontaktu z żywnością, i w konsekwencji może zostać transferowana do produktu końcowego (Wagner i in., 2020). Dodatkowo, należy podkreślić, że do czynników etiologicznych chorób przenoszonych za pośrednictwem żywności przynależą zarówno same mikroorganizmy, jak również wytwarzane przez nie metabolity, w tym toksyny, które mogą być zawarte w biofilmie (np. toksyna Shiga) (Galié i in., 2018). Zrozumienie roli biofilmu w funkcjonowaniu bakterii w przestrzeni produkcyjnej jest nieodzowne w celu zapewnienia należytej czystości mikrobiologicznej żywności. Świadomość zagrożenia niesionego przez opisane zjawisko powinno mieć odzwierciedlenie w prawidłowo prowadzonych procesach mycia i dezynfekcji, aby poza usunięciem komórek bakteryjnych zniszczyć, a następnie nie doprowadzić do ponownego utworzenia się biofilmu.

2. Zarządzanie bezpieczeństwem żywności

Każde przedsiębiorstwo produkujące i wprowadzające do obrotu żywność na terenie Polski funkcjonuje w ramach określonych realiów, aktów prawnych, norm i zasad branżowych. Przedsiębiorstwa zobowiązane są do respektowania większości z nich, szczególnie tych związanych z prawem krajowym i międzynarodowym. Jednakże, aby zbudować silną, rozpoznawalną markę, współpracującą z największymi podmiotami na rynku, niezbędne jest wdrożenie nieobowiązkowych standardów i norm. W niniejszym rozdziale pracy przedstawiono zarówno obowiązkowe jak i nieobowiązkowe zbiory regulacji w przemyśle spożywczym.

2.1. Uwarunkowania prawne bezpieczeństwa żywności w Polsce

Prawo żywnościowe w Polsce obciąża każdy z podmiotów produkujących artykuły rolno-spożywcze na terenie kraju do zapoznania się i przestrzegania wielu aktów prawnych ograniczających bądź regulujących kwestie kluczowe dla zapewnienia bezpieczeństwa i jakości żywności, uczciwej konkurencji czy odpowiedniego znakowania produktów pośrednio lub bezpośrednio przeznaczonych do spożycia przez ludzi i zwierzęta. Aktualnie pełna lista aktów prawnych zawiera 9 ustaw i 12 rozporządzeń o zasięgu krajowym oraz nadrzędne 23 rozporządzenia unijne. Część z nich dotyczy wszystkich producentów żywności bez względu na rodzaj produkowanych wyrobów żywnościowych, natomiast część przeznaczona jest dla określonych branż lub określonych grup produktowych. Poniżej zamieszczono tabelę 2.1., w której zebrano listę aktów prawnych dotyczących wszystkich producentów żywności okrojonej do tych dotyczących zapewnienia bezpieczeństwa żywności.

Kontrolę spełnienia wymogów prawnych zawartych w powyższych aktach sprawują w Polsce 4 instytucje: Państwowa Inspekcja Sanitarna, Inspekcja Weterynaryjna, Inspekcja Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych oraz Państwowa Inspekcja Ochrony Roślin i Nasiennictwa. Organy te mogą prowadzić kontrolę producentów żywności, w razie nieprawidłowości nakładać na nie sankcje, a w skrajnych przypadkach czasowo zamknąć zakład produkcyjny, w którym rażąco zaniedbano kwestie bezpieczeństwa żywności.

Tabela 2.1. Akty prawne regulujące działanie każdego przedsiębiorstwa produkującego żywność na terenie Polski

Akty prawne dotyczące bezpieczeństwa żywności obowiązujące w Polsce		
Akty prawa krajowego	Ustawa	Ustawa z dnia 14 marca 1985 r. o Państwowej Inspekcji Sanitarnej, Dz.U. 2019, poz. 59 z późn. zm.
		Ustawa z dnia 21 grudnia 2000 r. o jakości handlowej artykułów rolno-spożywczych, Dz.U. 2019, poz. 2178 z późn. zm.
		Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia, Dz.U. 2020, poz. 2021 z późn. zm.
	Rozporządzenie	Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 16 września 2010 r. w sprawie substancji wzbogających dodawanych do żywności, Dz.U. 2010, nr 174, poz. 1184
		Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 31 marca 2011 r. w sprawie naturalnych wód mineralnych, wód źródlanych i wód stołowych, Dz.U. 2011, nr 85, poz. 466
		Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 23 grudnia 2014 r. w sprawie znakowania poszczególnych rodzajów środków spożywczych, Dz.U. 2015, poz. 29.
Akty prawa unijnego	Rozporządzenie	Rozporządzenie (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności
		Rozporządzenie (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego
		Rozporządzenie (WE) nr 1924/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 20 grudnia 2006 r. w sprawie oświadczeń żywieniowych i zdrowotnych dotyczących żywności

Źródło: opracowanie własne na podstawie Prawo żywnościowe. Portal informacyjny o prawie żywnościowym (2023) dostęp: 21.06.2023

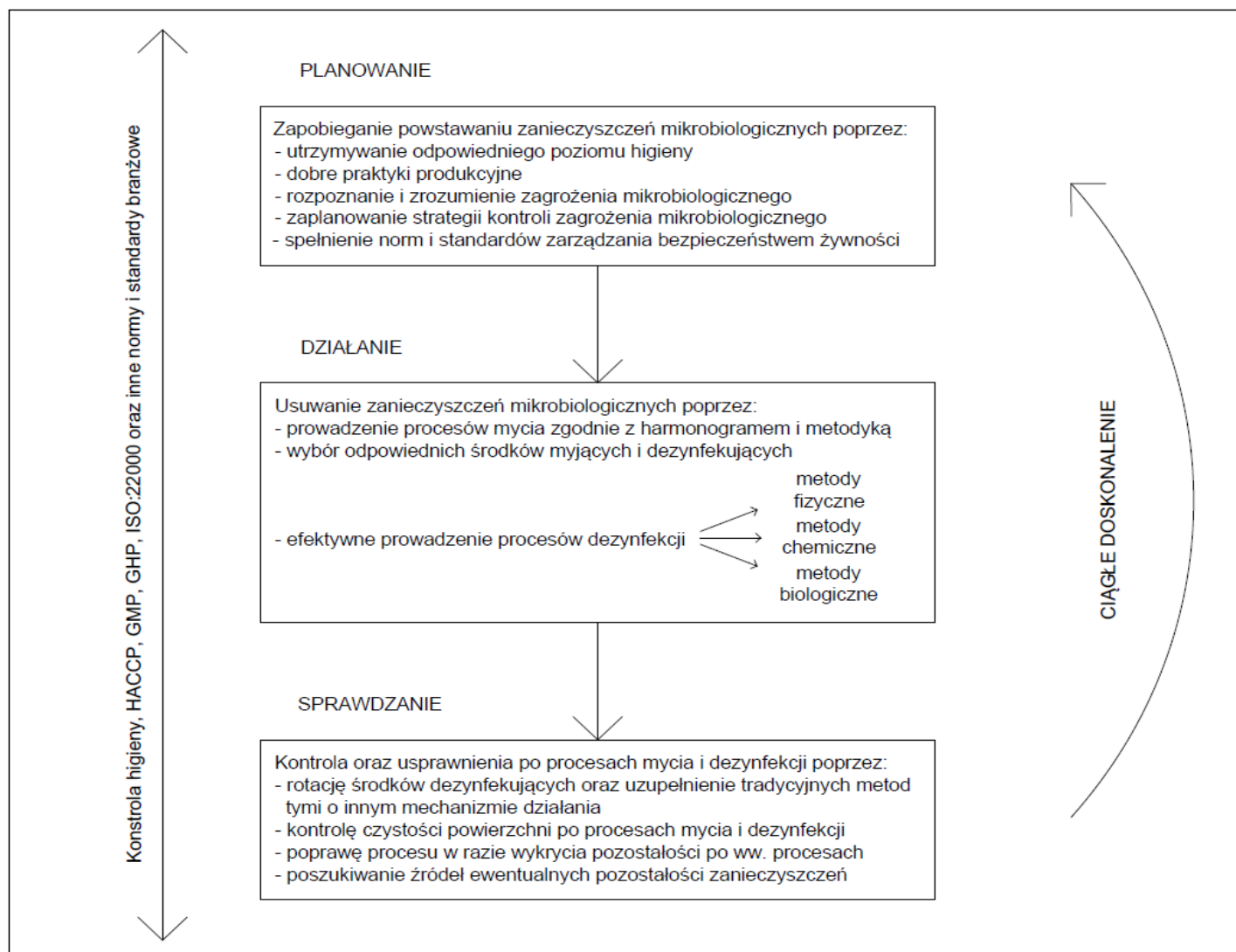
Powołując się na wnioski raportu NIK (Najwyższa Izba Kontroli) z 2022 roku, dotyczącego skuteczności urzędowych kontroli prawa żywnościowego w Polsce (BIP, 2022, dostęp 20.06.2023) należy zaznaczyć, że głównym gwarantem bezpieczeństwa żywności, szczególnie w obliczu jego nieczęstych nowelizacji, nie jest prawo żywnościowe obowiązujące na danym obszarze, czy też ryzyko skuteczniejszych kontroli urzędowych lecz przede wszystkim wewnętrzne systemy zapewnienia jakości i bezpieczeństwa żywności wprowadzone przez same przedsiębiorstwa.

2.2. Normy i podejście systemowe w zarządzaniu jakością mikrobiologiczną żywności

Aby zapewnić odpowiedni poziom czystości mikrobiologicznej w procesie produkcji żywności, szczególnie w świetle przedstawionych we wcześniejszej części danych dotyczących zanieczyszczeń żywności, ważne jest konsekwentne zarządzanie ryzykiem mikrobiologicznym na każdym etapie produkcji. Zgodnie z obowiązującymi praktykami odpowiednia procedura zarządzania czystością mikrobiologiczną w zakładzie produkcyjnym powinna obejmować następujące kroki: (1) zapobieganie powstawaniu zanieczyszczenia mikrobiologicznego, (2) usuwanie istniejącego zagrożenia mikrobiologicznego, (3) kontrola i prewencja po procesie mycia i dezynfekcji (rysunek 2.1.) (Płaza 2017; Zhao i in. al.2017, ISO 22000:2018). Aby skutecznie zapobiegać powstawaniu zanieczyszczeń mikrobiologicznych żywności, zgodnie z Kodeksem Żywnościowym, każdy producent żywności jest zobowiązany do wdrożenia zasad HACCP, które sprowadzają się do określenia punktów krytycznych, określenia dla nich mierzalnych kryteriów oraz ich stałego monitorowania (Kodeks Żywnościowy). Często takimi punktami krytycznymi są procesy pasteryzacji lub sterylizacji produktów, a także procesy mycia i dezynfekcji. Aby poprawnie zidentyfikować zagrożenia mikrobiologiczne, niezbędna są odpowiednia wiedza i świadomość, z jakimi mikroorganizmami można spotkać się na różnych etapach produkcji w zależności od gałęzi przemysłu spożywczego. Oprócz obowiązujących zasad HACCP, producenci żywności coraz częściej decydują się na wdrożenie dobrej praktyki produkcyjnej lub/i higienicznej (GMP, GHP). Często stanowią one podstawę dla bardziej wymagających norm w branży spożywczej, takich jak międzynarodowa norma zarządzania bezpieczeństwem żywności ISO: 22000, czy standardy branżowe, takie jak IFS Food (z ang. International Food Standard), BRC (z ang. British Retail Consortium) czy nawet bardziej szczegółowe – prywatne standardy partnerów

biznesowych. Normy te, oprócz wymagań dotyczących identyfikacji i monitorowania punktów kontrolnych, zobowiązują firmy do systematycznej, udokumentowanej dezynfekcji z użyciem odpowiedniego środka sanityzującego, prowadzenie pomiarów kontrolnych po zakończonych procesach oraz wdrażanie działań korygujących w przypadku nieskutecznego mycia i dezynfekcji (ISO 22000:2018). Powyższe zasady, standardy oraz odpowiednia higiena utrzymywana podczas procesu produkcji żywności pozwalają skutecznie zapobiegać i ograniczać skalę strat wynikających z zagrożenia mikrobiologicznego.

Standardy i normy nie mogą jednak zapewnić absolutnego bezpieczeństwa. Niezbędne jest zaplanowanie i systematyczne przeprowadzanie procesów czyszczenia i dezynfekcji z użyciem odpowiednio dobranych środków odkażających (Yuan i in., 2020; Zhao i in., 2017). Po dezynfekcji należy przeprowadzić procedurę kontrolną, aby upewnić się, że wybrane środki dezynfekujące są skuteczne. Zmniejszająca się skuteczność może świadczyć o uodpornieniu drobnoustrojów na stosowane środki dezynfekcyjne. Aby uniknąć tego zjawiska, konieczna jest rotacja środków dezynfekcyjnych i uzupełnienie tradycyjnych rozwiązań metodami alternatywnymi o innym mechanizmie biobójczym (Donaghy i in., 2019). Słabsze efekty dezynfekcji mogą być również spowodowane innymi czynnikami, często ludzkimi, dlatego ważne jest, aby znaleźć przyczynę w przypadku niepełnej dezynfekcji i wprowadzić działania korygujące przed kolejnym procesem. Odpowiednie zarządzanie ryzykiem i bezpieczeństwem żywności poparte wiedzą i odpowiednio dobranymi środkami myjącymi i dezynfekującymi są w stanie zapewnić niemal całkowite bezpieczeństwo mikrobiologiczne produktów spożywczych.

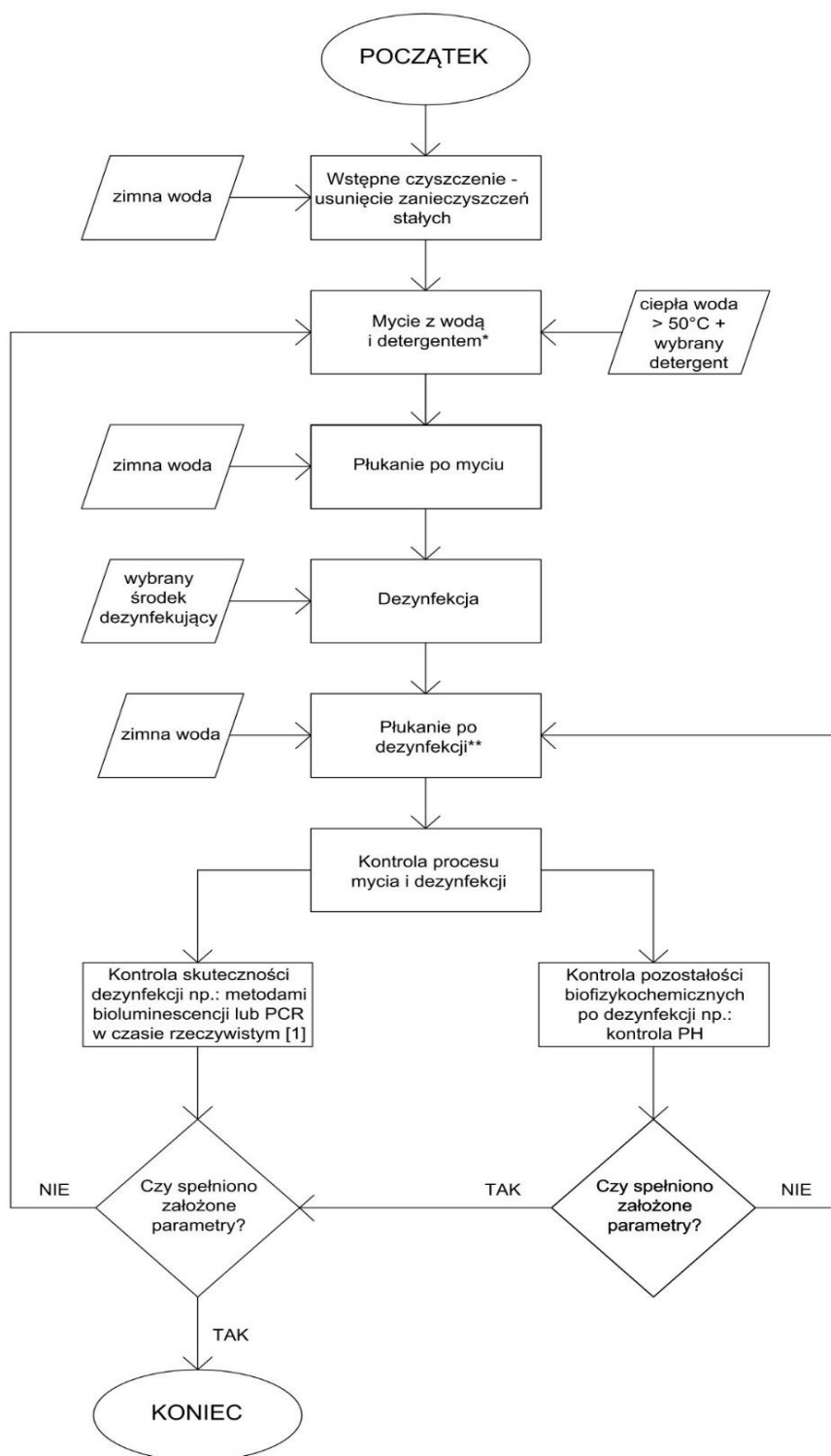


Rysunek 2.1. Schemat modelowego podejścia do zarządzania bezpieczeństwem żywności w przemyśle spożywczym

źródło: opracowanie własne na podstawie (Płaza 2017; Yuan i in., 2020; Zhao i in., 2017; ISO 22000:2018)

3. Procesy mycia i dezynfekcji w przemyśle spożywczym

Bakterie chorobotwórcze mogą stanowić zagrożenie niemal na każdym etapie łańcucha produkcji wyrobów spożywczych, generując coraz większą liczbę zachorowań przenoszonych przez żywność w różnych regionach świata (Zhao i in., 2017). Problem zanieczyszczenia żywności mikroorganizmami zwykle zaczyna się od zanieczyszczenia powierzchni abiotycznych. Powszechnie, aby zapewnić odpowiedni poziom higieny produkcji, stosuje się codzienne procesy mycia i dezynfekcji w celu kontroli i usuwania zanieczyszczeń bakteryjnych. Schemat blokowy takiej procedury przedstawiono na schemacie 3.1. (Iñiguez-Moreno i in., 2017). Proces czyszczenia wstępnego usuwa resztki jedzenia, zabrudzenia i materię organiczną, które gromadzą się na powierzchniach podczas produkcji. Procesy mycia pozwalają usunąć do 90% bakterii, jednak bez ich zabijania, dlatego daje to tylko efekt tymczasowy (Iñiguez-Moreno i in., 2017; Yuan i in., 2020). Kluczowy dla zapewnienia jakości mikrobiologicznej w przemyśle spożywczym jest proces dezynfekcji. Ma to bezpośredni wpływ na jakość i bezpieczeństwo produktu w całym jego cyklu życia (Cuggino i in. 2020; Meireles, Giaouris i Simões 2016). Na skuteczność tego procesu wpływa szereg powiązanych ze sobą czynników, takich jak: rodzaj i charakter czyszczonej powierzchni, zawartość i rodzaj materii organicznej pozostającej na dezynfekowanej powierzchni, rodzaj mikroorganizmów typowych dla danej branży, temperatura, pH, czas ekspozycji na środek dezynfekujący, stężenie i co najważniejsze – rodzaj środka dezynfekującego (Cuggino i in., 2020; Ma i in., 2019; Posada-Izquierdo i in., 2013; Yim i in., 2021).



Rysunek 3.1. Schemat blokowy procedury czyszczenia, mycia i dezynfekcji w przemyśle spożywczym

źródło: opracowanie własne na podstawie (Wirtanen i Salo, 2003; Sansemastiano i in., 2007) [1] (Rajapaksha, 2019)

*wybrany detergent może należeć do grupy alkalicznych lub kwaśnych. Można także stosować mycie obydwoma, z zachowaniem dodatkowe płukania pomiędzy ich stosowaniem.

**płukanie po dezynfekcji ma zastosowanie wtedy, kiedy pozostałości środka dezynfekującego mogą dostać się do produktu spożywczego, zagrażać personelowi lub powodować korozję urządzeń.

Zgodnie z oficjalnymi metodami analizy AOAC, standard odkażania w zakresie redukcji zanieczyszczenia powierzchni abiotycznych mających kontakt z żywnością jest ogólnie akceptowany jako 99,999% (redukcja o 5 log) osiągnięty w 30 sekund (Cuggino i in. 2020). Proces dezynfekcji odgrywa kluczową rolę w inaktywacji i eliminacji bakterii chorobotwórczych do poziomu akceptowalnego przez organy kontrolne i normy bezpieczeństwa.

Jak już wspomniano, proces dezynfekcji odgrywa kluczową rolę w zwalczaniu mikroorganizmów z abiotycznych powierzchni produkcyjnych, stanowiąc zdecydowanie najskuteczniejszą spośród wszystkich strategii walki z zagrożeniami mikrobiologicznymi. Warto jednak podkreślić, że dla zapewnienia stałego, kompleksowego bezpieczeństwa mikrobiologicznego w procesie produkcji żywności ważne są również inne czynniki, takie jak: utrzymanie higieny pracowników, dbałość o jakość mikrobiologiczną surowców, a także nadzorowane, przetestowane i udoskonalane procesy mycia (zgodnie z kołem Deminga przedstawione w normach zarządzania jakością żywności ISO:22000), a także ocena, kontrola i zarządzanie ryzykiem mikrobiologicznym (Farber i in., 2021; Filter i in., 2021).

3.1. Systematyczny przegląd literatury w obszarze środków dezynfekujących w przemyśle spożywczym

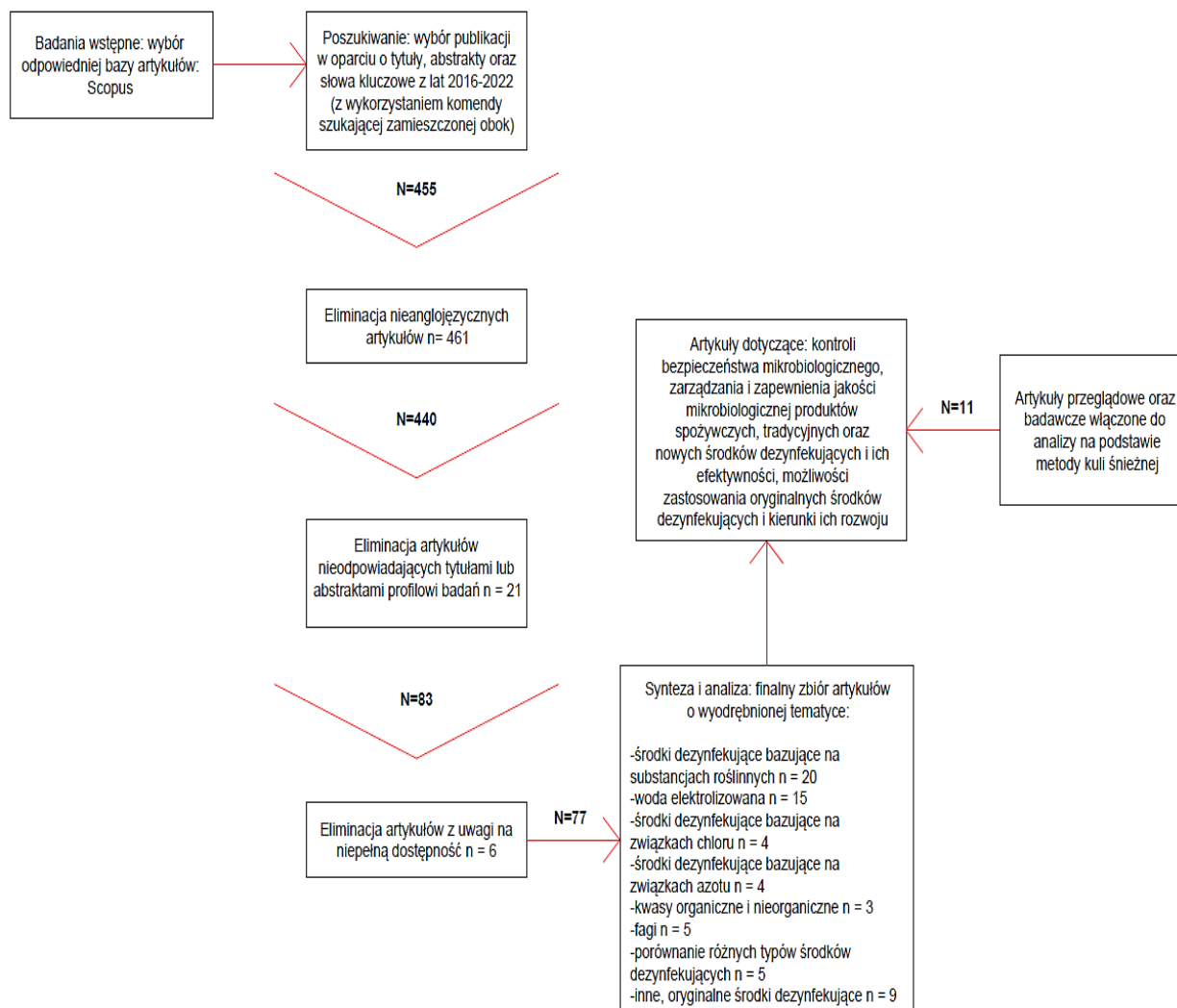
W celu udzielenia odpowiedzi na pytania, jakie strategie ograniczania i monitorowania zagrożeń mikrobiologicznych są obecnie stosowane w przemyśle spożywczym oraz jakie są kierunki rozwoju środków dezynfekujących przeprowadzono przegląd literatury będący podsumowaniem badań w tym zakresie z ostatnich sześciu lat. W niniejszym przeglądzie, będącym jednocześnie rozdziałem pracy doktorskiej, skupiono się również na środkach dezynfekcyjnych, w tym skuteczności ich działania na powierzchniach abiotycznych (stal nierdzewna, HDPL, szkło), spektrum aktywności i możliwości zastosowania w przemyśle spożywczym. Podsumowano również badania nad nowoczesnymi środkami dezynfekcyjnymi zawierającymi substancje naturalne, które mogą stanowić alternatywę dla obecnie stosowanych środków.

Systematyczny przegląd literatury oparty został na metodzie SALSA (wyszukiwanie, ocena, synteza, analiza – z ang.: *Search, Appraisal, Synthesis, Analysis*) (Booth, 2016) i procedurze kuli śnieżnej (Jalali i Wohlin 2012). W przeglądzie uwzględniono oryginalne artykuły

badawcze oraz artykuły przeglądowe na temat strategii kontroli drobnoustrojów, metod i używanych środków dezynfekujących z ostatnich 5 lat (2016-2022). Kompleksowy przegląd literatury został przeprowadzony w październiku 2022 r. przy użyciu internetowej bazy danych Scopus (Elsevier). Uwzględniono w nim tylko prace opublikowane w języku angielskim. Schemat procesu badawczego został zaprezentowany na rysunku 3.2. Na początku zidentyfikowano łącznie 455 (N) artykułów. W kolejnym kroku usunięto artykuły nieanglojęzyczne, co pozwoliło zredukować liczbę artykułów do N=440. Następnie dokonano oceny treści na podstawie tytułów i abstraktów, co zaowocowało wyborem najważniejszych (N=92) artykułów i prac przeglądowych. Na podstawie analizy treści wykluczono publikacje dotyczące dezynfekcji powierzchni biotycznych, a także publikacje, w których badane substancje były dodawane bezpośrednio do produktu w celu działania konserwującego (N=83). Na drodze analizy pełnych treści artykułów wyłączono jeszcze 6 artykułów z uwagi na ich niepełną dostępność. W niniejszej publikacji wykorzystano również kilka artykułów i innych źródeł wykraczających poza ten zakres (N=11). Zostały one włączone do analizy na podstawie metody kuli śnieżnej, co skutkowało w rezultacie finalnej bazy artykułów wykorzystanych do przeprowadzenia systematycznego przeglądu literatury (N=73). Wybrane artykuły zostały przeanalizowane pod kątem poszukiwania odpowiedzi na postawione pytania badawcze:

- Jakie są trendy w światowej literaturze naukowej w obszarze tradycyjnych i alternatywnych środków dezynfekujących w ostatnich latach?
- Jaką skuteczność dezynfekcji i przy jakich warunkach uzyskano dla substancji badanych w ramach analizowanych artykułów?

Odpowiedzi na powyższe pytania wraz z podsumowaniem metod dezynfekcji przedstawiono w tabelach 3-5. Substancje podzielono zgodnie z klasyfikacją zaproponowaną przez Iñiguez-Moreno i in. (2017) na: chemiczne, fizyczne i biologiczne. W poniższej charakterystyce, opracowanej na podstawie przeprowadzonego przeglądu literatury, zestawiono najczęściej stosowane substancje uwzględniając szczegółowe informacje dotyczące zakresu i efektu oddziaływania oraz stosowanych stężeń.



Rysunek. 3.2. Uproszczony schemat wykorzystanej metodologii SALSA

źródło: opracowanie własne na podstawie (Szutowska, 2020)

3.2. Chemiczne metody dezynfekcji

Chemiczne związki przeciwdrobnoustrojowe, takie jak: chlor, nadtlenek wodoru, kwas nadoctowy czy czwartorzędowe związki amoniowe znane ze swojej skuteczności są szeroko stosowane od wielu lat. Niestety, preparaty chemiczne mają również istotne wady, ponieważ używane w zbyt wysokich stężeniach mogą być odpowiedzialne za korozję urządzeń i linii produkcyjnych (Fukuzaki, 2006) i zwykle są toksyczne dla środowiska i ludzi. Szacuje się, że około 25% stosowanych czwartorzędowych soli jonowych dostaje się do środowiska głównie ze ściekami po dezynfekcji. Cierpią na tym szczególnie wrażliwe na zanieczyszczenia organizmy wodne, natomiast, gdy wspomniane związki dostaną się do gleby, skutkuje to

pojawieniem się w roślinach stresu oksydacyjnego. Ludzie wystawieni na ekspozycję QAC narażeni są na kontaktowe zapalenie skóry, podrażnienie dróg oddechowych oraz alergie (Telesiński i in., 2016). Ponadto, powszechne stosowanie chemicznych środków dezynfekcyjnych prowadzi do wzrostu tolerancji i odporności wielu mikroorganizmów. Przykładowo, bakterie z gatunku *L. monocytogenes* mogą rozwinąć tolerancję względem klasycznych środków dezynfekujących, takich jak kwas nadoctowy czy czwartorzędowe związki amoniowe, w miarę ich stosowania (Baranowska i Rodziewicz 2008; Bridle i in. 2011; Fagerlund i in. 2017; Yuan i in. 2020). Znanym jest również mechanizm uodparniania się bakterii Gram-ujemnych na związki chloru, w tym najskuteczniejszy - podchloryn sodu. Co więcej, stosowanie związków chloru wzmacnia odpowiedź bakterii i stymuluje ich mechanizmy antybiotykoodporności (da Cruz i in., 2020). Istnieje zatem konieczność opracowania nowego, niewywołującego mechanizmów antybiotykoodporności, przyjaznego dla środowiska, środka dezynfekującego, który będzie w stanie inaktywować drobnoustroje chorobotwórcze bez negatywnego wpływu na zdrowie konsumentów i bezpieczeństwo środowiska. Niemniej, chemiczne preparaty do dezynfekcji są nadal najczęściej wykorzystywane spośród wszystkich dostępnych związków, a w pracach naukowych nad alternatywami są zwykle punktem odniesienia dla nowych związków czy sposobów ograniczania występowania zagrożenia mikrobiologicznego. Poniżej zamieszczono tabelę 3.1., w której podsumowano środki dezynfekujące skategoryzowane jako chemiczne.

Tabela 3.1. Związki chemiczne potencjalnie lub realnie wykorzystywane w dezynfekcji zakładów przemysłu spożywczego będące przedmiotem badań w latach 2016-2022, wyodrębnionych w ramach systematycznego przeglądu literaturowego

środek dezynfekujący	Mikroorganizm	Stężenie/ warunki	Zaobserwowany efekt	Źródło
Lekko kwaśna woda elektrolizowana (SAEW)	<i>L. innocua</i>	70 ppm/5min	Znaczna redukcja biofilmu <i>L. innocua</i> na powierzchniach mających kontakt z żywnością	(Jeon, Kwon, i Yoon 2017)
Kwaśna woda elektrolizowana (AEW)	<i>E. coli</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> <i>L. monocytogenes</i>	NaCl stężenie 3.0 g/L 5 min	Redukcja biofilmu o 67% (dla <i>E. coli</i>), 52% (dla <i>V. parahaemolyticus</i>) 82% i (dla <i>L. monocytogenes</i>)	(Han i in., 2017)
AEW oraz SAEW	<i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i>	40, 60, 80, 100 i 120 mg/L 1,2 i 3 min w 22°C	Redukcja <i>B. subtilis</i> i <i>B. cereus</i> po kontakcie z AEW o: 0,36-4,45 log CFU/ml, podczas gdy po użyciu SAEW o 0,47-6,86 log w zależności od stężenia i warunków	(Zhang i in., 2016)

AEW	<i>B. cereus</i>	0-50 mg/L 0-20 min pH 2.73-6.00	Redukcja populacji mikroorganizmów o od 4,45 do 0,54 log CFU/cm ² w zależności od stężenia i warunków	(N. W. Li, Liu, i Liu 2017)
SAEW	<i>B. cereus</i>	20, 40, 60, 80, 100 i 140 mg/L 0-10 min	Redukcja populacji <i>B. cereus</i> o od 7,19 do 0,2 CFU/ml w zależności od czasu kontaktu i stężenia	(Hussain, Tango, i Oh 2019)
SAEW	<i>S. aureus</i>	1 min	Redukcja liczebności bakterii o 5,8 log CFU/ml, zmniejszono względną aktywność dehydrogenazy TTC o 65,84%, wyciek białka na poziomie 108,34%	(Ding i in., 2016)
Neutralizowana woda elektrolizowana (NEW)	<i>E. coli</i> <i>B. cereus</i>	100, 75, 25, 5 i 1% temperatura 22 i 50°C, 1, 3 i 5 min	We wszystkich badanych warunkach użycia NEW znacząca redukcja liczby bakterii (np. w temperaturze 22°C w ciągu 1 minuty o 8,5 log jtk/ml dla <i>E. coli</i> i 6,3 log jtk/ml dla <i>B. cereus</i>)	(Yamaner i in., 2016)
NEW i SAEW	<i>L. monocytogenes</i>	50-200 mg/L 0-6 min	Użycie SAEW spowodowało większe zmniejszenie <i>L. monocytogenes</i> : 2,30 do 5,64 log CFU/cm ² , w porównaniu z NEW: 1,55 do 5,22 log CFU/cm ²	(Possas i in., 2021)
AEW + ultrasonikacja	<i>B. cereus</i>	950-W, 20-kHz 30 i 200 mg/mL 30 min	Jednoczesne zabiegi ultradźwiękowe i AEW przez 30 minut doprowadziły do redukcji o 2,29 log CFU/ml	(Lv i in., 2020)
Woda aktywowana elektrochemicznie (ECA)	<i>S. Heidelberg</i>	200 ppm 5 i 10 min w 25°C	Redukcja o 2,691 log jtk/ml i 2,119 log jtk/ml, odpowiednio dla 5 i 10 min	(Wilsmann i in., 2020)
Woda ozonowana	<i>L. monocytogenes</i>	0, 1, 2 i 4 ppm 1 min	Redukcja o 0,9 log CFU - 4,1	(Korany i in., 2018)
QAC		0, 100, 200 i 400 ppm 1 min	Redukcja o 2,6-3,6 log CFU	
chlor		0, 100 i 200 ppm 1 min	Redukcja o 2,0-3,1 log CFU	
dwutlenek chloru		0, 2.5 i 5 pm 1 min	Redukcja o 2,4-3,8 log CFU	
PAA		0, 80, 160 i 200 ppm 1 min	Redukcja log CFU o 3,6-4,8	
Podchloryn sodu (pH=7), podchloryn wapnia i QAC	<i>B. anthracis</i>	Podchloryn sodu 1-3000 ppm, 0,1-podchloryn wapnia 300 ppm i QAC 0.5-50000 ppm	50 ppm podchlorynu sodu (pH 7), 1 ppm podchlorynu wapnia i 1 ppm QAC całkowicie wyeliminowały komórki w stanie wegetatywnym (>6 log CFU / ml). 3000 ppm podchlorynu sodu (pH 7) i 300 ppm podchlorynu wapnia znacznie wyeliminowały zarodniki bakterii (>7 log CFU / ml)	(Yim i in., 2021)

Izopropyl + QAC	<i>Salmonella sp.</i>	IPAQ/ 30 s, 1 min i 5 min	Średnia redukcja o 6,0-log	(Kane i in., 2016)
11 komercyjnych środków dezynfekcyjnych na zawierających kwasy, QAC lub chlor	<i>L. monocytogenes</i>	86-6302 ppm/1-3 min	Do środków dezynfekcyjnych zawierających pojedyncze substancje czynne redukcja biofilmów <i>L. monocytogenes</i> na powierzchni ze stali nierdzewnej wynosiła od 2,3 do 4,6 log CFU. Całkowitą redukcję komórek biofilmu <i>L. monocytogenes</i> osiągnięto za pomocą mieszaniny środków dezynfekujących, takich jak QAC z nadtlenkiem wodoru lub PAA z nadtlenkiem wodoru i kwasem oktanowym w stężeniu 25 lub 50% zalecanego stężenia	(Dhowlaghar i in., 2018)
Podchloryn sodu z izotiocyanianem benzylu (BITC)	<i>S. enterica</i>	BITC: 20, 40, 60 i 80 mg/L. Stężenie wolnego chloru 50, 100, 150 i 200 (mg/l)	Średnia redukcja o 2,5 log jtk/g. Optymalna kombinacja: 160 mg/l wolnego chloru i 40 mg/l BITC	(Cuggino i in., 2020)
Dwutlenek chloru	<i>E. coli</i> O157:H7 <i>S. typhimurium</i> <i>L. monocytogenes</i>	20 ppmv/0-30 min w 15 i 25°C	Redukcja o 1,88 – 2,31 log na powierzchni szklanej dla ClO ₂ w 25 °C przez 20 min. Na powierzchni ze stali nierdzewnej redukcja o 1,25 - 1,61 log CFU/cm ² w zależności od warunków i mikroorganizmów	(Park i Kang, 2018)
Synergistyczne działanie kwasu fitynowego i chlorku sodu	<i>E. coli</i> O157:H7	PA (0%, 0.1%, 0.2%, 0.4% NaCl (0%, 1%, 2%, 3%, 4%))	Redukcja <i>E. coli</i> O157: H7 o > 6,5 log CFU / cm ² przy połączeniu 0,4% PA z 3-4% NaCl. Ani samo PA, ani NaCl nie były tak skuteczne (PA, redukcja o 1,6–2,7 log CFU/cm ² ; NaCl, redukcja o 0,5 log CFU/cm ²)	(Kim i Rhee, 2016)
Siarczan kwasu sodowego	<i>E. coli</i>	0.1, 1, i 3%/ 0-480 min	Redukcja <i>E. coli</i> o >6 log CFU/cm ² przy stężeniu 0,1% na powierzchni ze stali nierdzewnej. Na powierzchni HDPE ten sam efekt osiągnięto przy stężeniu 1%	(Weeraratne i in., 2021)
Kwas glikolowy (GA) i glioksal (GO)	<i>B. cereus</i> <i>P. fluorescens</i>	GA 99% i GO 40%/1-30 min in 25°C	Redukcja <i>P. fluorescens</i> >5 log CFU/ml przez GA przy 1000 µg/ml i przez GO przy 15000 µg/ml	(Fernies, Gomes, i Simões 2020)
Kwas kaprylowy (CA) i nadtlenek wodoru (HP)	<i>S. enterica</i> <i>E. coli</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i>	0.05-3%/15 min	Bakterie Gram (-) były hamowane przez HP i CA w stężeniu 0,5%, a Gram (+) przez 2% roztwór. CA wykazała mniejszą skuteczność niż HP przeciwko <i>E. coli</i> .	(Výrostková i in., 2020)

Kwas nadctowy (PAA) i kwas nadmśrowkowy (PFA)	<i>Cl. tyrobutyricum</i> , <i>Cl. propionicum</i> <i>Cl. malenominatum</i>	PAA 30-220 mg/L i PFA 30-120 mg/L 5-10 min	PAA, przy maksymalnym badanym stężeniu 220 mg/l, wyeliminowano 6/30 szczepów <i>Clostridium</i> , podczas gdy PFA całkowicie wyeliminował 26/30 w stężeniu 120 mg/l	(Mora, Veijalainen, i Heinonen-Tanski 2018)
6 komercyjnych środków dezynfekujących i 4 kwasy	<i>E. coli</i> O26	0,0156–25,6% dla środków dezynfekujących i 0,64–65,536 µg/ml dla kwasów	Profoam, Kwixsan 22 i Topactive DES hamowały wzrost bakterii. Pozostałe trzy środki dezynfekujące (Dairy Chlor 12,5%, Envirosan i Maxifoam) nie były skuteczne. MIC kwasu octowego, propionowego, mlekowego i cytrynowego w zakresie od 1024 do 4096 µg/ml	(Lajhar, Brownlie, i Barlow 2017)
Kwasy organiczne (cytrynowy, jabłkowy, czosnkowy, kwasy)	<i>B. subtilis</i>	1% i 2%/5-20 min	Usunięcie biofilmu wynosiło 41-84% w zależności od czasu, użytych kwasów i ich stężenia. Kwas cytrynowy był tak silny jak chlor w zapobieganiu i usuwaniu biofilmów. Działanie antybiofilmowe kwasu jabłkowego było wyższe niż kwasu galusowego i mniejsze niż kwasu cytrynowego.	(Akbas i Cag, 2016)
Wodorosiarczany sodu (SBS), nizyna i ich kombinacja	<i>L. monocytogenes</i>	0.75-2%	Wartości MIC: 0,75 i 1,5% dla SBS oraz 0,5, 1 i 2% dla nizyny. Zmniejszenie stężenia jtk/ml o 1,23–2,66 log w zależności od stężenia	(Bodie i in., 2019)
trzecio- i pięciorzędowe QAC,	<i>E. coli</i> <i>S. enterica</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> <i>L. monocytogenes</i>	200-400 ppm/5-15 min	Wartość MIC w zakresie 64-1,5 µl/ml w zależności od czasu kontaktu i stężenia	(Iñiguez-Moreno i in., 2017)
Nadtlenek wodoru		20000 ppm/5-15	Wartość MIC w zakresie 16384-8192 µl/ml w zależności od czasu kontaktu	
Enzymy nadtlenku wodoru		1000 i 8000 ppm/5-15	Wartość MIC w zakresie 256-64 µl/ml w zależności od czasu kontaktu	
organiczny ekstrakt z pestek grejpfruta		2000 ppm/5-15	Wartość MIC w zakresie 1024-128 µl/ml w zależności od czasu kontaktu	
podchloryn sodu		200 ppm/5-15	Wartość MIC wynosiła 64 µl/ml	

źródło: opracowanie własne

3.2.1. Środki dezynfekujące zawierające związki chloru

Obecnie najpopularniejszymi i jednymi z najskuteczniejszych środków dezynfekujących są te zawierające w swoim składzie związki chloru (najczęściej podchlorynu sodu). NaOCl zwykle stosuje się w stężeniu 50-200 mg/l uwzględniając czas kontaktu w granicach 1-3 minut (Pablos i in., 2018). Środki te cieszą się popularnością głównie ze względu na niskie koszty, łatwość aplikacji oraz szerokie spektrum działania. Przykładowo, Yim i in. (2021) wykazali, że komercyjne środki dezynfekcyjne chlorowe, przygotowane w stężeniu 200 ppm, są skuteczniejszymi środkami dezynfekującymi niż związki czwartorzędowych soli amoniowych i alkoholu przeciwko bakteriom z gatunku *B. cereus*. Do podobnego wniosku doszli Laban i in. (2019), którzy porównali komercyjne środki dezynfekujące zawierające związki chloru lub amonu na różnych powierzchniach, na których znajdowały się bakterie *C. jejuni*. Chlorowe środki dezynfekujące są również szeroko stosowane przeciwko innym powszechnie występującym patogenom w przemyśle spożywczym, takim jak *S. Typhimurium*, *E. coli* czy *L. monocytogenes* (Park i Kang 2018). Mimo niewątpliwych zalet, chlorowe środki dezynfekujące mają również wiele wad, które zmuszają badaczy do poszukiwania alternatyw. Przede wszystkim związki chloru indukują mechanizmy oporności mikroorganizmów na środki dezynfekcyjne, co stanowi ogromne zagrożenie XXI wieku (Donaghy i in., 2019; Yim i in., 2021). Należy również podkreślić, że chlor, reagując z materią organiczną, może uwalniać związki rakotwórcze, takie jak: trihalometany i chloraminy, prowadzi także do korozji urządzeń ze stali nierdzewnej, wnika w produkt zmieniając jego walory sensoryczne, takie jak smak i zapach oraz stwarza zagrożenie dla konsument (Cuggino i in. 2020; Pablos i in. 2018).

3.2.2. Środki dezynfekcyjne zawierające czwartorzędowe sole amoniowe (QAC)

Czwartorzędowe związki amoniowe (QAC) to kationowe środki powierzchniowo czynne, z których najczęściej stosowanymi są chlorek benzalkoniowy, chlorek benzetonowy i chlorek cetylopirydynowy (Meireles, Giaouris i Simões 2016). QAC wykazują działanie słabsze od podchlorynu, wymagają też wyższego stężenia (200-400 mg/L), mimo to stanowią jedne z najczęściej spotykanych środków dezynfekujących na rynku. Ich popularność wynika m.in. z faktu, że w przeciwieństwie do związków chloru nie powodują korozji urządzeń, są bezwonne, nietoksyczne dla użytkowników i mniej szkodliwe dla środowiska. Ich

antybakteryjne działanie opiera się na mechanizmie blokowania pobierania pokarmu przez bakterie poprzez wiązanie z kwaśnymi fosfolipidami w ścianie komórkowej bakterii (Wang i in. 2018). QAC są wysoce skuteczne przeciwko bakteriom Gram-dodatnim w szerokim zakresie pH i temperatury (Meireles, Giaouris i Simões 2016). W przypadku niektórych gałęzi przemysłu spożywczego uzasadnione jest stosowanie środków dezynfekcyjnych zawierających QAC zamiast środków zawierających związki chloru z uwagi na rodzaj mikroorganizmów stanowiących dominujące zagrożenie. Takie podejście sprawdza się przede wszystkim w gałęziach przemysłu, w których głównym zagrożeniem są bakterie z gatunku *L. monocytogenes*. Potwierdzają to badania, m.in. przeprowadzone przez Silvę i in. (2017), którzy udowodnili, że komercyjny środek dezynfekujący na z QAC miał znacznie silniejsze działanie przeciwko *L. monocytogenes* niż preparaty chlorowe. Warto jednak zauważyć, że wadą QAC jest mniejsza aktywność biobójcza w twardej wodzie oraz zakaz bezpośredniego stosowania w żywności (Meireles, Giaouris i Simões 2016).

3.2.3. Woda elektrolizowana

Woda Elektrolizowana (EW) to stosunkowo nowy środek dezynfekujący, który został dopuszczony do stosowania w przemyśle spożywczym w UE w 2018 roku. Do jego wytworzenia potrzebna są jedynie woda i sól (NaCl lub KCl). Działanie elektrolizowanej wody opiera się na zasadzie elektrolizy membranowej soli. Główną substancją aktywną powstającą w tym procesie jest kwas podchlorawy (HOCl), który odpowiada za działanie bakteriobójcze (Orejel i CanoBuendía 2020). W procesie elektrolizy można otrzymać wodę elektrolizowaną kwaśną, obojętną lub zasadową. Każda z nich charakteryzuje się innym pH oraz potencjałem oksydacyjno-redukującym (ORP), których wartość wskazuje na zdolność do utleniania lub „odbierania” elektronów od innych związków chemicznych. Wysokie wartości ORP sprawiają, że EW jest doskonałym środkiem dezynfekującym (Jiménez-Pichardo i in. 2016; Orejel i CanoBuendía 2020). Han i in. (2017) stwierdzili, że sposób ten jest nie tylko skuteczny w dezynfekcji, ale także doskonale usuwa biofilm bakterii chorobotwórczych (np.: *L. monocytogenes*). Zwracają też uwagę na fakt, że elektrolizowana woda nie powoduje wtórnych zanieczyszczeń i jest bezpieczna dla ludzi i środowiska, co oznacza, że może stać się alternatywnym środkiem dezynfekującym dla dotychczasowych środków. Orejel i CanoBuendía (2020) wskazują ponadto, że technologia wytwarzania EW jest ekologiczna i prosta, a przy tym można ją przeprowadzić na miejscu, co pozwala znacznie obniżyć koszty

transportu. Co więcej, EW jest skuteczna niezależnie od temperatury, co pozwala na stosowanie jej zarówno w warunkach chłodniczych, jak i w podwyższonych temperaturach. Warto również zwrócić uwagę na fakt, że EW po zużyciu powraca do swojej naturalnej postaci, nie obciąża środowiska naturalnego i nie wymaga unieszkodliwiania (Rahman, Khan i Oh 2016), dlatego sugeruje się, że EW nie sprzyja wzrostowi oporności bakterii (Hricova, Stephan i Zweifel 2008). Badania wskazują, że EW ma szerokie spektrum działania przeciwko mikroorganizmom, w tym mikroorganizmom chorobotwórczym i może być z powodzeniem stosowana jako środek dezynfekujący w niemal każdej gałęzi przemysłu spożywczego (Rahman, Khan i Oh 2016). Yamaner i in. (2016) udowodnili skuteczność 5% zneutralizowanej wody elektrolizowanej wobec bakterii *B. cereus*, a jako zaletę zastosowanego środka dezynfekcyjnego wskazali brak działania korozyjnego i brak kosztów magazynowania. Z kolei Ding i in. (2016) wykazali, że przy 1-minutowym czasie kontaktu lekko octowa EW w stężeniu 30 mg/L okazała się skuteczniejszym środkiem dezynfekującym przeciwko bakteriom z gatunku *S. aureus* niż NaOCl i HCl. Jeon, Kwon i Yoon (2018) wykazali również, że 5 minutowe mycie powierzchni 70 mg/L EW skutecznie usuwa biofilm wytworzony przez bakterie *L. innocua*. Nie można jednak zapominać o wadach wody poddanej elektrolizie, ponieważ jej stosowanie wymaga dużego jednorazowego kosztu związanego z zakupem urządzeń, a w trakcie przechowywania traci ona swoją skuteczność dezynfekcyjną. Ponadto powoduje podobne problemy jak konwencjonalne chlorowe środki dezynfekcyjne – podrażnia skórę pracowników, powoduje podrażnienie dróg oddechowych u operatorów generatorów, a przy zbyt niskim pH powoduje korozję urządzeń stalowych (Rahman, Khan i Oh 2016). Mimo to woda elektrolizowana jest polecana jako alternatywny środek dezynfekcyjny dla przemysłu spożywczego, głównie ze względu na szerokie spektrum działania oraz brak udowodnionego wpływu na mechanizmy odporności mikroorganizmów.

3.2.4. Środki dezynfekcyjne zawierające kwasy

Słabe kwasy organiczne to związki otrzymywane w sposób naturalny lub syntetyzowane chemicznie. Najczęściej stosowane są kwas cytrynowy, octowy i mlekowy, a także działający w znacznie niższych stężeniach kwas nadoctowy (PAA) (Meireles, Giaouris i Simões 2016). Ich sposób działania opiera się na zakwaszeniu cytoplazmy, zaburzeniu siły napędowej protonów, stresie osmotycznym i hamowaniu syntezy makrocząsteczek (Carpenter i Broadbent, 2009). Głównymi zaletami stosowania kwasów organicznych jako środków

odkażających są: brak toksycznych produktów ubocznych podczas stosowania oraz naturalne pochodzenie (Meireles, Giaouris i Simões 2016). Należy również zaznaczyć, że są to zazwyczaj związki bardzo skuteczne w działaniu bakteriobójczym i usuwaniu biofilmu. Akbas i Cag (2016) zbadali skuteczność czterech metod leczenia kwasami organicznymi (cytrynowego, jabłkowego i galusowego) w stężeniach 1% i 2% w zapobieganiu i usuwaniu biofilmów wytworzonych przez bakterie *B. subtilis*. W badaniach najsilniejsze działanie wykazał kwas cytrynowy, usuwając komórki bakteryjne i biofilm równie skutecznie jak chlor w dedykowanym stężeniu. Lajhar, Brownlie i Barlow (2017) osiągnęli najlepsze wyniki w eliminacji szczepów *E. coli* dla kwasu octowego i propionowego, określając minimalne stężenie hamujące na poziomie 1024 µg/ml. Mora, Veijalainen i Heinonen-Tanski (2018) zbadali skuteczność dwóch nadtlenu organicznych; kwas nadoctowy (PAA) i kwas nadmrówkowy (PFA) względem 30 szczepów bakterii z rodzaju *Clostridium*. PAA w stężeniu 220 mg/l wyeliminował tylko 6/30 szczepów, podczas gdy PFA całkowicie wyeliminował 26/30 szczepów *Clostridium* w stężeniu 120 mg/l, stąd też PFA wydaje się być silniejszym środkiem dezynfekującym niż częściej stosowany PAA. Kwasy organiczne mają jednak swoje ograniczenia. Przykładowo, PAA może drażnić pracowników i powodować korozję, podczas gdy działanie przeciwdrobnoustrojowe PAA jest optymalne tylko w podwyższonych temperaturach, przy kwaśnym pH i przy braku materiału organicznego (Weerarathne i in., 2021). Kwasy nieorganiczne są również dobrze znane jako potencjalne środki odkażające, a kwaśny siarczan sodu (SAS) wydaje się być najbardziej obiecującym środkiem do dezynfekcji powierzchni abiotycznych. Weerarathne i in. (2021) udowodnili skuteczność SAS w tworzeniu biofilmu *E. coli* na powierzchniach ze stali nierdzewnej i HDPE. Użycie kwaśnego siarczanu sodu (w stężeniach 1% i 3%) było bardziej skuteczne niż stosowanie QAS, PAA lub chloru. Bodie i in. (2019) oraz Dittoe i in. (2019) wykazali skuteczność SAS w zwalczaniu bakterii *L. monocytogenes* i *Salmonella* sp. Skuteczność działania sprawia, że zainteresowanie kwasami organicznymi w kontekście ich zastosowania jako środków odkażających wzrasta, jednak należy mieć na uwadze ich ograniczenia w stosowaniu. Dla większości z nich potencjał jest większy w zastosowaniu do produktów spożywczych niż przy zastosowaniu do dezynfekcji powierzchni mających kontakt z żywnością (np. kwas mlekowy) (Stanojević-Nikolić i in., 2016).

3.3. Biologiczne i fizyczne metody dezynfekcji

Do grupy metod biologicznej dezynfekcji w przemyśle spożywczym zaliczane są przede wszystkim: działanie bakteriofagami, enzymami, bakteriocynami, ale również zwyczajowo włącza się w tę grupę fitochemikalia, czyli związki wytwarzane naturalnie przez rośliny w celu walki głównie z mikroorganizmami. Tabela 3.2. zawiera podsumowanie metod biologicznych analizowanych w toku przeprowadzonego przeglądu. Do metod tych włączono także metody fizyczne, z uwagi na ich małą liczebność występowania w artykułach z badanego okresu i obszaru. Poza wskazanymi metodami fizycznymi istnieją także metody działania zimną plazmą, wysoką temperaturą czy możliwość zastosowania zamrażania, jednak ich przydatność w procesach dezynfekcji powierzchni abiotycznych w zakładach produkcji żywności wydaje się być mocno ograniczona.

Tabela 3.2. Związki biologiczne oraz alternatywne metody fizyczne potencjalnie lub realnie wykorzystywane w dezynfekcji zakładów przemysłu spożywczego będące przedmiotem badań w latach 2016-2022, wyodrębnionych w ramach systematycznego przeglądu literaturowego

środek dezynfekujący	Mikroorganizm	Stężenie/ warunki	Zaobserwowany efekt	Źródło
Olejki eteryczne: (<i>Eriosephalus africanus</i> L., <i>Artemisia</i> <i>absinthium</i> L., <i>Santolina</i> <i>chamaecyparissus</i> L., <i>Mentha longifolia</i> (L) L., <i>Thymbra capitata</i> (L.) Cav., <i>Citrus limon</i> (L.) Osbeck, <i>Citrus</i> <i>reticulata</i> Blanco i <i>Eucalyptus</i> <i>camaldulensis</i> Dehnh i sanitizer based on <i>T.</i> <i>capitata</i>	<i>E. coli</i> O157:H7 <i>S. enterica</i>	0,0-1,0% dla olejków eterycznych i 0,25-2,5% dla środków odkażających zawierających <i>T. capitata</i>	MIC dla różnych olejków eterycznych od 0,05 do ponad 1%. Naturalny środek odkażający zawierający 2,5% <i>T. capitata</i> EO był skuteczny przeciwko <i>E. coli</i> (redukcja > 3 log ale miał ograniczony wpływ na <i>S. enterica</i>	(Falcó i in., 2019)
Ekstrakt z goździków	<i>S. Typhimurium</i> <i>E. coli</i> <i>L. monocytogenes</i>	0.25-1.50%	Strefa zahamowania dla <i>S. typhimurium</i> wynosiła od 8,8 do 13,73 mm	(Ishaq i in., 2019)
Produkty uboczne oliwy z oliwek	<i>C. jejuni</i> <i>C. coli</i>	0.075 mg/mL to 5 mg/mL	MIC i MBC od 0,15 do 0,30 mg/ml	(Roila i in., 2019)
Olejek eteryczny z oregano i karwakrol	<i>S. aureus</i>	OVEO (10 i 5 μL/mL), CAR (5 i 2.5 μL/mL)/ 10 i 15 min	Dla OVEO redukcja biofilmu <i>S. aureus</i> o 1,0-3,0 log CFU/cm ² , dla CAR o 1,5-3,1 log CFU/cm ² . Dłuższa ekspozycja i wyższe stężenie powodowały wyższe wartości redukcji	(Rodrigues i in., 2018)

<i>Satureja khuzistanica</i> Jamzad - ekstrakt	<i>S. aureus</i> <i>B. cereus</i> <i>E. coli</i> <i>S. enterica</i> <i>Sh. flexneri</i>	0-100 µg/ml	MIC olejku eterycznego od 28,7-114,7 µl / ml w zależności od szczepu. Dla ekstraktu etanolowego MIC wynosił 80-640 µl/ml	(Mahboubi i Kazempour 2018)
<i>Origanum vulgare</i> – olejek eteryczny	<i>P. fluorescens</i>	0.075-40 µl/ml	Olejek eteryczny z oregano hamuje tworzenie biofilmu szczepów <i>P. fluorescens</i> i zmienia ich ruchliwość. MIC = 0,63 µl/ml, podczas gdy MBC = 5,0 µl/ml	(Rossi i in., 2016)
Proantocyjanidyny z chińskiej jagody bayberry	<i>S. epidermidis</i>	n.d.	MIC = 320 µl/ml, natomiast MBC = 640 µl/ml	(Zou i in., 2020)
Ekstrakt acetonowy rodzynek	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. typhimurium</i> <i>E. coli</i>	100-6,25 mg/ml	MIC = 25 mg/ml przeciwko <i>S. aureus</i> i 100 mg/ml dla innych badanych bakterii	(Abouzeed i in., 2018)
Olejki eteryczne pozyskiwane z: <i>Enteromorpha linza</i> , <i>Undaria pinnatifida</i> , <i>Laminaria japonica</i> , i <i>Porphyra tenera</i>	<i>L. monocytogenes</i>	n.d.	MIC i MBC wszystkich czterech olejków eterycznych od 12,5 - 25,0 mg/ml	(Patra i Kwang-Hyun Baek 2016)
Olejek cynamonowy	<i>P. aeruginosa</i> <i>A. baumannii</i>	n.d.	Średnice strefy zahamowania odpowiednio dla <i>A. baumannii</i> i <i>P. aeruginosa</i> 44 i 35 mm	(Kaskatepe i in., 2016)
Ekstrakty z czarnej herbaty (<i>Camelliasinensis</i>)	<i>B. cereus</i> <i>S. aureus</i> <i>S. saprophyticus</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>P. vulgaris</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>P. putida</i> <i>S. marcescens</i>	n.d.	Dla bakterii Gram(+) średnica strefy zahamowania wynosił od 14,33±0,58 mm do 16,67±0,58 mm, MIC od 3,0 mg/ml do 10,0 mg/ml dla ekstraktu metanolowego (najsukuteczniejszego). Dla bakterii Gram(-) strefa zahamowania od 12,33±0,58 mm do 17,33±0,58 mm, MIC od 5,0 mg / ml do 13,0 mg / ml	(Patil i in., 2016)
Kwas mlekowy	<i>E. coli</i> <i>P. mirabilis</i> <i>S. enteritidis</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> <i>E. faecalis</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>B. cereus</i> <i>B. megaterium</i>	5-100 mg/mL	MIC i MBC dla bakterii Gram(-) odpowiednio od 1,25- 2,5 do 2,5-5,0 mg / ml, podczas gdy dla szczepów Gram(+) 1,25- 18,75 i 25,5-37,5 mg / ml	(Stanojević-Nikolić i in., 2016)
Lauric arginate ester (LAE)	<i>L. monocytogenes</i> <i>E. coli</i> <i>Salmonella</i> spp.	50, 100 i 200 ppm 2 h	Redukcja komórek biofilmu o 7 log CFU/cm ² i 3,5 log CFU/cm ² odpowiednio na powierzchniach ze stali nierdzewnej i gumy	(Sadekuzzaman i in., 2017)

Nizyna i monolauryna	<i>S. aureus</i>	0.1 – 100 mg/mL	MIC nizyny i monolauryny przeciwko <i>S. aureus</i> odpowiednio: 10 mg/ml i 100 mg/ml	(Sadiq i in., 2016)
Preparat enzymatyczny (amylaza, proteaza i lipaza)	n.d.	30 min/ 45-55°C	Czyszczenie enzymatyczne mieszaną amylazą, proteazą i lipazą powoduje >82% zmniejszenie żywotności bakterii i zawartości polisacharydów EPS na powierzchni PET. Na powierzchni SS redukcja bakterii >82%, zawartość EPS zmniejszyła się o 45%	(Tsiaprazi-Stamou i in., 2019).
Enzymy	<i>S. enterica</i> <i>C. sakazakii</i>	dwie formuły enzymatyczne (proteaza 5-10%; Lipaza 0,5-1%; amylaza 2,5-5%) 45-50°C	Obróbka enzymatyczna wykazała znaczące zmniejszenie o 2–3 log (jtk/cm ²) w komórkach biofilmu	(Ripolles-Avila i in., 2020)
Światło ultrafioletowe	<i>E. coli</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>S. enterica</i>	Ekspozycja na UV 259, 268, 289 i 370 nm/1-500 s	Redukcja log od 0,06 do 4,33 w zależności od częstotliwości i długości fali. Diody UV o długości fali UV przy około 280 nm okazały się najskuteczniejsze pod względem inaktywacji bakterii	(Green i in., 2018)
C14 s, L1, LL15, i V9 - bakteriofagi	<i>E. coli</i> O157:H7	>10 ⁸ PFU/ml	Fagi mogą być komplementarnie obecne w chlorze wolnym od 100 ppm i kwasie nadoctowym 100 ppm, co czyni je jeszcze bardziej skutecznymi środkami dezynfekującymi	(Jagannathan i in., 2020)
PhilPLA-RODI - bakteriofagi	<i>S. aureus</i>	10 ⁵ PFU/ml	Wartości MIC (dla fagów) dla chlorku benzalkoniowego, triklosanu, chlorheksydyny i nadtlenu wodoru wynosiły odpowiednio 1 µg/ml, 0,25 µg/ml, 2 µg/ml i 0,6 mM. Chlorek benzalkoniowy był najbardziej odpowiedni do stosowania w miejscach, w których należy stosować fagi	(Agún i in., 2018)
DT1-DT6 bakteriofagi <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	10 ⁷ -10 ⁸ PFU/ml	Wysoki poziom przeżycia fagów w 100% etanolu, w 10 ppm podchlorynu sodu, preparaty fagowe mogą przetrwać ponad 1 rok w warunkach przechowywania	(Tomat i in., 2018)
Produkty komercyjne oparta na fagach: ListShield™ i Listex™ P100	<i>L. monocytogenes</i>	n.d.	MIC dla Listex™ P100 wynosił 2,8 * 10 ³ - 3,7 * 10 ⁶ , dla ListShield™ 2,1 * 10 ⁵ -2,1 * 10 ⁷ PFU / ml	(Gutiérrez i in., 2017)

źródło: opracowanie własne
n.d. – nie dotyczy

3.3.1. Bakteriofagi jako środki dezynfekujące

Bakteriofagi, potocznie znane jako fagi, to wirusy bakteryjne, które atakują i replikują się w komórkach bakterii, a w przypadku faga litycznego zakłócają metabolizm bakteryjny, który powoduje lizę bakterii. Bakteriofagi są obecnie uważane za obiecującą alternatywę dla antybiotyków i środków dezynfekujących (Agún i in., 2018). W ostatnich latach ich zastosowanie w przemyśle jako środków dezynfekujących lub dodatków było często kwestionowane ze względów bezpieczeństwa, jednak obecnie wiele z nich uzyskało status GRAS (z ang. *Generally Recognized As Safe* - powszechnie uznawany za bezpieczny) i zostało dopuszczonych do stosowania w przemyśle spożywczym jako środek wspomagający utrzymanie bezpieczeństwa żywności (Jagannathan i in., 2020). Fagi wykazują obiecujące rezultaty w zwalczaniu bakterii chorobotwórczych, przeciwko którym są przeznaczone. Ich selektywność działania można uznać zarówno za plus, jak i minus – głównie ze względu na brak szerokiego spektrum działania. Jagannathan i in. (2020) wykazali skuteczność fagów wyizolowanych z kału bydłęcego przeciwko enterokrwotocznym szczepom *E. coli* O157: H7. Autorzy zasugerowali jednak, że znacznie lepsze efekty synergii można uzyskać dodając bakteriofagi do tradycyjnych środków dezynfekujących, takich jak chlor czy kwas nadoctowy. Jest to możliwe, ponieważ fagi przeżywają stężenia do 100 mg/L obu tych substancji. Agún i in. (2018) doszli do podobnych wniosków, badając fagi antygronkowcowe – doszli do wniosku, że połączenie koktajlu fagowego i chlorku benzalkoniowego byłoby najbardziej odpowiednie do zastosowania w warunkach, w których mają być stosowane fagi. Połączenie bakteriofagów z innymi tradycyjnymi środkami dezynfekującymi może zapewnić możliwość odwrócenia mechanizmów inaktywacji mikroorganizmów, a tym samym znacząco zmniejszyć problem oporności na powszechnie stosowane związki (Tomat i in., 2018). Komercyjne środki fagowe mogą eliminować bakterie chorobotwórcze typowe dla danego przemysłu (np.: *L. monocytogenes* w przemyśle rybnym). Efekt ten może być niezwykle przydatny, szczególnie tam, gdzie powtarzają się infekcje tym samym szczepem bakterii. Warto również zaznaczyć, że preparaty zawierające fagi zachowują skuteczność także przez wiele dni po zakończeniu procesu dezynfekcji (nawet do 14 dni), co oznacza, że można je stosować uzupełniając raz na kilka cykli (de Oliveira i in., 2020). Naukowcy są jednak zgodni co do tego, że potrzebne są dalsze badania w celu przetestowania działania preparatów

bakteriofagowych w miejscu aplikacji podczas dezynfekcji przemysłowej (Agún i in., 2018; Jagannathan i in., 2020; Pinto, Almeida i Azeredo 2020).

3.3.2. Środki dezynfekujące zawierające olejki i ekstrakty roślinne

Jednymi z obiecujących alternatyw wśród związków biologicznie czynnych, które mogą rozwiązać niektóre problemy tradycyjnych środków dezynfekujących, są olejki eteryczne, ekstrakty roślinne i ich bioaktywne składniki (Orhan-Yanikan i in., 2019). Substancje roślinne o wysokiej aktywności biologicznej są obecnie popularne wśród badaczy i konsumentów. Ułatwiony dostęp do informacji i trendy proekologiczne skutkują poszukiwaniem nowych rozwiązań dla silnie zanieczyszczającego środowisko środków dezynfekujących. Takimi związkami są oleje i ekstrakty roślinne, które są substancjami całkowicie naturalnymi, nieindukującymi mechanizmów oporności mikroorganizmów i mogą być z powodzeniem stosowane w przemyśle spożywczym do zwalczania mikroorganizmów i usuwania ich biofilmów (Falcó i in., 2019). Olejki eteryczne wielu roślin znane są ze swoich właściwości biobójczych wobec bakterii planktonowych, a składniki olejków, takie jak karwakrol, eugenol, tymol czy wanilina, zostały przebadane pod kątem ich zastosowania jako środków dezynfekujących i usuwających biofilm wobec bakterii typowych dla przemysłu spożywczego (Orhan -Yanikan i in. 2019). Karwakrol i tymol hamowały wzrost bakterii chorobotwórczych *E. coli* i *Acinetobacter baumannii* w najniższych testowanych stężeniach, 0,1-0,2 mg/ml, a także skutecznie usuwały dojrzały biofilm. Medina-Rodríguez i in. (2020) wykazali, że ekstrakt cytrusowy w stężeniu 2,5% był tak samo skuteczny jak podchloryn sodu w usuwaniu bakterii *L. monocytogenes*, *E. coli* i *Pseudomonas putida* na powierzchni stalowej. Choi i in. (2021) stwierdzili, że dodanie ekstraktów z prosa różgowego do 70% etanolu spowodowało całkowitą eliminację żywotnych komórek *E. coli* i *S. Typhimurium* w czasie kontaktu 10 minut, co może stanowić alternatywę dla środków dezynfekujących zawierających związki chloru i QAC. Romeu, Rodrigues i Azeredo (2020) również stwierdzili, że karwakrol jest w stanie z powodzeniem usuwać młody i dojrzały biofilm i wykazali, że podobny efekt wykazuje również olejek eteryczny z oregano. Inni badacze z powodzeniem stosowali ekstrakt z nasion papai, ekstrakt z pestek winogron, ekstrakt z kocimiętki *Faassena*, ekstrakt z liści *Moringa oleifera*, ekstrakt z goździków, oliwę z oliwek, olejek eteryczny z oregano, śluz suma, ekstrakty z ryżyny, m.in. olejki eteryczne z linzy, olejek cynamonowy i czarna herbata (Abouzeed i in., 2018; Dhowlaghar i in., 2018; Ishaq i in., 2019; Jianu i in., 2021; Kaskatepe

i in., 2016; P. Li i in., 2021; de Oliveira i za l. 2020; Roila i in. 2019). Niewątpliwie substancje ziołowe i roślinne wymagają dalszych badań, a ze względu na swoją skuteczność mogą stać się substytutem lub uzupełnieniem obecnie stosowanych środków dezynfekujących. Jednak, jak wszystkie środki dezynfekujące, mają one również swoje wady. Przede wszystkim są bardzo lotne, a większość z nich ma silny zapach, który może powodować migrację związków lotnych do produktu, zmieniając jego specyficzne cechy sensoryczne. Ponadto ich pozyskanie jest stosunkowo drogie. Istotne jest również przeprowadzenie większej liczby badań skupiających się na możliwości zastosowania wyżej wymienionych związków w dezynfekcji powierzchni abiotycznych zgodnie z przyjętymi normami, gdyż dopiero Falcó i in. (2019) oraz Medina-Rodríguez i in. (2020) badali przygotowane środki tak, jakby były dostępnymi w handlu środkami dezynfekującymi.

W tym miejscu warto zaznaczyć istotność tych fitozwiązków, które są bezpośrednio odpowiedzialne za siłę działania przeciwdrobnoustrojowego każdej z roślin. Spośród tych związków, jednymi z najczęściej oznaczanych grup są fenole. Na ich sumę składają się: zawartość związków polifenolowych, kwasów fenolowych, lignanów, stilbenów, kumaryn i flawonoidów (Tarko i in., 2013). Polifenole znane są szerzej głównie jako przeciwutleniacze, dzięki czemu zyskują popularność w medycynie ze względu na możliwość eliminowania wolnych rodników. Niemniej, wybranym grupom fenoli, a także innym związkom występującym w roślinach, przypisuje się silne działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze (Chun i in., 2005).

3.3.3. Enzymy

Enzymy są uważane za ekologiczne środki zaradcze przeciwko tworzeniu się biofilmu w przemyśle spożywczym ze względu na ich biodegradowalność i niską toksyczność. To czyni je potencjalnymi alternatywnymi środkami dezynfekującymi dla przemysłu spożywczego. Zastosowanie enzymów jest szczególnie skuteczne w usuwaniu biofilmów bakteryjnych, poprzez niszczenie zewnątrzkomórkowej matrycy polimerowej. Tsiaprazi-Stamou i in. (2019) wykazali, że enzymy były bardzo skuteczne w usuwaniu biofilmu, zwłaszcza na powierzchniach stalowych. Traktowanie preparatem łączącym amylazę, proteazę i lipazę z 1 godzinnym czasem kontaktu skutecznie zmniejszyło całkowitą masę biofilmu mieszanego, żywotność bakterii i zawartość polisacharydów w biofilmie. Ripolles-Avila i in. (2020), którzy badali możliwość wykorzystania enzymów przeciwko tworzeniu biofilmu przez bakterie

S. Typhimurium i *Cronobacter sakazakii*, stwierdzili, że zastosowanie metod enzymatycznych może być skutecznym rozwiązaniem na etapie przyczepiania biofilmu. Autorzy zasugerowali, że enzymy mogą wspomagać proces dezynfekcji, ale ostatecznie nie są uważane za środek odkażający. Głównym ograniczeniem w stosowaniu enzymów w dezynfekcji są: wysokie koszty, wymagany długi czas kontaktu (zwykle powyżej 1 godziny) oraz skuteczność tylko w określonych, wysokich temperaturach (45-55°C).

3.3.4. Inaktywacja fotodynamiczna

Inaktywacja fotodynamiczna (PDI z ang.: Photodynamic inactivation) to technologia oparta na wykorzystaniu promieniowania widzialnego (VIS) do inaktywacji różnego rodzaju zanieczyszczeń bakteryjnych. Metoda ta prowadzi do powstawania reaktywnych form tlenu, które są szkodliwe dla komórek i powodują ich śmierć. Zdecydowanymi zaletami takiego rozwiązania są: możliwość zastosowania do dowolnej powierzchni bez jej uszkodzenia, brak toksyczności, a także możliwość synergistycznego połączenia z tradycyjnymi metodami dezynfekcji (Angarano i in., 2020). Autorzy zbadali cztery różne kolory światła VIS na trzech różnych powierzchniach (stal nierdzewna, aluminium, guma) zanieczyszczonych przez *P. fluorescens*. Wyniki pokazały, że fiolet był jedyną barwą światła, która powodowała jakąkolwiek inaktywację komórek planktonowych *P. fluorescens* w zawiesinie. W przypadku pojedynczych komórek na abiotycznej powierzchni aluminiowej światło fioletowe było również jedynym kolorem, który mógł skutkować pełną inaktywacją w ciągu 30 minut naświetlania. Po dodaniu czynnika stresu temperaturowego, światło niebieskie również okazało się skuteczne. Mimo to, wykorzystanie światła do dezynfekcji powierzchni produkcyjnych wydaje się trudne do osiągnięcia, głównie ze względu na konstrukcję maszyn i linii produkcyjnych. Ich konstrukcja często uniemożliwia dotarcie światła we wszystkie miejsca, co może uczynić tę metodę nieskuteczną (Meireles, Giaouris i Simões 2016).

Jak wynika z powyższej analizy, związki chloru nadal wydają się być najbardziej powszechnymi i najskuteczniejszymi spośród omówionych środków dezynfekcyjnych. Mimo to przedstawiony przegląd wskazuje na wiele możliwych kierunków rozwoju alternatywnych środków dezynfekcyjnych dla powierzchni abiotycznych w przemyśle spożywczym. Podsumowując dokonany przegląd można stwierdzić, że najpopularniejsze badania dotyczą możliwości wykorzystania na większą skalę wody poddanej elektrolizie oraz fitochemikaliów występujących w olejkach i ekstraktach roślinnych. Całkowite odejście od tradycyjnych

środków dezynfekujących, takich jak chlor i QAC, jest obecnie niemożliwe, ale uzupełnienie procesów dezynfekcji innymi, alternatywnymi metodami wydaje się być w zasięgu ręki. Stosowanie związków pochodzenia naturalnego, takich jak olejki eteryczne czy ekstrakty roślinne, wskazywałoby na potencjalne korzyści dla środowiska naturalnego. Najbardziej optymalnym sposobem zapewnienia bezpieczeństwa żywności w przemyśle spożywczym jest podejście mieszane obejmujące: wykorzystanie wiedzy pracowników i menedżerów, doświadczenie, podejście systemowe oraz skuteczne procesy mycia i dezynfekcji.

Część empiryczna

4. Cele i hipotezy badawcze

Biorąc pod uwagę powyższe implikacje z analizy literatury przedmiotu, w niniejszej rozprawie podjęto próbę pozyskania środków pochodzenia roślinnego oraz zastosowania ich w formułacji środka dezynfekującego, mniej obciążającego środowisko naturalne niż tradycyjnie stosowane preparaty, przeznaczonego dla przemysłu spożywczego. W celu ukierunkowania planowanych prac, w ramach rozprawy sformułowano następujące pytanie badawcze: Jakie są możliwości wykorzystania substancji roślinnych jako czynnika dezynfekującego w przemyśle spożywczym? W nawiązaniu do postawionego pytania badawczego sformułowano cel główny badań, którym było stworzenie formułacji skutecznego środka dezynfekującego dla przemysłu spożywczego z wykorzystaniem ekstraktów roślinnych. Cel główny zrealizowano w oparciu o cele szczegółowe zawarte w tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Zestawienie celów szczegółowych wyznaczonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej

Lp.	Cel szczegółowy	Odniesienie w rozprawie
1	Ocena właściwości przeciwdrobnoustrojowych wybranych ekstraktów CO ₂ i olejków roślinnych dostępnych w handlu	6.1.
2	Ocena właściwości przeciwdrobnoustrojowych i antybiofilmowych pozyskanych laboratoryjnie różnymi metodami ekstraktów z roślin: gojnika (<i>Sideritis Scardica</i>), oregano (<i>Origanum vulgare</i>) oraz konopi (<i>Cannabis S. Sativa</i> i <i>Cannabis S. Indica</i>)	6.2.2. 6.2.3.
3	Opracowanie formułacji środka dezynfekującego zawierającego ekstrakty roślinne, o najsilniejszym potencjale przeciwdrobnoustrojowym i antybiofilmowym	6.3.
4	Ocena możliwości zastosowania opracowanego preparatu oraz zakwalifikowania go jako skutecznego środka dezynfekującego w przemyśle spożywczym według normy: PN-EN 13697+A1:2015	6.3.
5	Analiza cyklu życia (LCA) opracowanych formułacji środków dezynfekujących zawierających substancje roślinne i porównanie go pod tym względem do środków dostępnych w handlu.	6.4.1. 6.4.2.

Źródło: opracowanie własne

W nawiązaniu do postawionych celów i w oparciu o analizę literatury sformułowano hipotezy badawcze przedstawione w tabeli 4.2.

Tabela 4.2. Hipotezy badawcze sformułowane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej

Symbol	Hipoteza badawcza (H)	Odniesienie w rozprawie
H1:	Ekstrakty roślinne charakteryzują się właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi i antybiofilmowymi w stosunku do mikroorganizmów stanowiących największe zagrożenie w przemyśle spożywczym	6.2.2. 6.2.3.
H2:	Formulacje środków dezynfekujących zawierające ekstrakty roślinne jako główny czynnik przeciwdrobnoustrojowy są skuteczne w dezynfekcji powierzchni abiotycznych i mogą zostać uznane za skuteczny środek dezynfekujący zgodnie z normą PN-EN 13697+A1:2015	6.3.
H3:	Skuteczna formuła dezynfekująca wykorzystująca ekstrakty CO ₂ charakteryzuje się najmniejszym obciążeniem środowiskowym spośród stworzonych wariantów	6.4.1. 6.4.2.
H4:	Opracowane preparaty dezynfekujące charakteryzują się mniejszym wskaźnikiem obciążenia środowiskowego liczonego z wykorzystaniem metody LCA, niż popularne dezynfektanty dostępne w handlu (podchloryn sodu, kwas nadoctowy i kwas nadmanganowy)	6.4.1. 6.4.2.

Źródło: opracowanie własne.

5. Metodyka badawcza

5.1. Materiał badawczy, odczynniki, mikroorganizmy wskaźnikowe

Materiał roślinny

Świeże rośliny gojnika (*Sideritis Scardica*), oregano (*Origanum vulgaris*) oraz konopi (*Cannabis S. Santhica* i *Cannabis S. Futura*) zostały zakupione w sklepach internetowych w roku 2021 bezpośrednio od plantatorów (po 1 kg). Materiał roślinny został następnie poddany suszeniu (36°C w suszarce z obiegiem świeżego powietrza przez 48h) i przechowywany (w temperaturze pokojowej, w opakowaniach barierowych z tworzywa sztucznego) do czasu rozpoczęcia dalszych etapów badań. Bezpośrednio przed przeprowadzeniem ekstrakcji materiał roślinny poddawano rozdrobnieniu z wykorzystaniem młynka laboratoryjnego.

Wykaz odczynników

Wszystkie wykorzystane odczynniki były przechowywane w przystosowanym do tego celu pomieszczeniu zgodnie z zaleceniami producenta zamieszczonymi na opakowaniu. Poniżej zamieszczono wykaz odczynników chemicznych, użytych w trakcie realizacji pracy doktorskiej (tabela 5.1.).

Tabela 5.1. Odczynniki chemiczne wykorzystane w trakcie pracy badawczej

L.p.	Odczynnik	Producent
1.	Chloroform cz.d.a.	Chempur, Polska
2.	CO ₂	Air Products Sp, Polska
3.	DMSO (Dimetylosulfotlenek)	Sigma Aldrich, Niemcy
4.	Etanol 99,8%	Chempur, Polska
5.	Fiolet krystaliczny 0,1%	Sigma Aldrich, Niemcy
6.	Heksan cz.d.a.	Chempur, Polska
7.	kwask galusowy	Sigma Aldrich, Niemcy
8.	kwask octowy 30%	Chempur, Polska
9.	Metanol cz.d.a.	Chempur, Polska
10.	odczynnika Folin-Ciocalteu	Sigma Aldrich, Niemcy
11.	węglanu sodu 20%	POCH, Polska
12.	Bufor fosforanowy 0,25 mol/l	Sigma Aldrich, Niemcy

Źródło: opracowanie własne

Ekstrakty i olejki handlowe

Ekstrakty i olejki handlowe, wykorzystane na początkowym etapie badań zakupiono w sklepie internetowym producenta składników do produkcji kosmetyków ECOSPA. Poniżej zamieszczono tabelę z produktami handlowymi marki ECOSPA i AromatherapyOils wykorzystanymi w badaniach (tabela 5.2.).

Tabela 5.2. Olejki i Ekstrakty CO₂ zakupione w celu przeprowadzenia badań pilotażowych

Olejek/Ekstrakt CO ₂	Pochodzenie	Producent
Olejek i Ekstrakt CO ₂	<i>Lavandula Angustifolia</i>	ECOSPA
Olejek i Ekstrakt CO ₂	<i>Rosmarinus Officinalis L</i>	ECOSPA
Olejek i Ekstrakt CO ₂	<i>Boswellia Serrata</i>	ECOSPA
Ekstrakt CO ₂	<i>Origanum vulgare</i>	ECOSPA
Olejek	<i>Origanum vulgare</i>	AromatherapyOils
Olejek i Ekstrakt CO ₂	<i>Cannabis Sativa CBD</i>	ECOSPA
Ekstrakt CO ₂	<i>Melissa officinalis</i>	ECOSPA
Olejek	<i>Melissa officinalis</i>	AromatherapyOils
Ekstrakt CO ₂	<i>Mentha piperita</i>	ECOSPA
Olejek	<i>Mentha piperita</i>	AromatherapyOils

Źródło: opracowanie własne

Mikroorganizmy wskaźnikowe

Mikroorganizmy wskaźnikowe pochodziły z kolekcji ATCC (ang. *American Type Culture Collection*). Długoterminowo wszystkie mikroorganizmy były przechowywane w fiolkach kriogenicznych MicrobankR (ProLab, Kanada) w temperaturze -22°C. Przed wykonaniem badań dotyczących właściwości przeciwdrobnoustrojowych i antybiofilmowych ekstraktów roślinnych mikroorganizmy namnażano na odpowiednim podłożu i inkubowano przez 24 godziny w odpowiednich warunkach. Szczegółowe informacje dotyczące mikroorganizmów wskaźnikowych przedstawiono w tabeli 5.3.

Tabela 5.3. Mikroorganizmy wskaźnikowe wykorzystane w trakcie pracy badawczej

L.p.	Mikroorganizm	Warunki inkubacji (temperatura/ atmosfera)	Podłoże mikrobiologiczne
Bakterie Gram-dodatnie			
1.	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC® 11774™	37°C/tlenowa	Standards Methods (Plate Count Agar) (Biomaxima, Polska)
2.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 33862™	37°C/tlenowa	
3.	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC® 1911™	37°C/tlenowa	Brain Heart Infusion (Biomaxima, Polska)
4.	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 19433™	37°C/tlenowa	
5.	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC® 4698™	30°C/tlenowa	Trypticasein Soy Agar (Biomaxima, Polska)
6.	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC® 13124™	37°C/tlenowa	
Bakterie Gram-ujemne			
7.	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218™	37°C/tlenowa	Standards Methods (Plate Count Agar) (Biomaxima, Polska)
8.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 9027™	37°C/tlenowa	
9.	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC® 33291™	37°C/tlenowa	Brain Heart Infusion (Biomaxima, Polska)
10.	<i>Salmonella enterica</i> ser. Enteritidis ATCC® 13076™	37°C/tlenowa	

Źródło: opracowanie własne.

5.2. Otrzymywanie ekstraktów roślinnych

Procedury otrzymywania ekstraktów z roślin gojnika (*Sideritis Scardica*), oregano (*Origanum vulgare*) i konopi (*Cannabis S. Santhica* i *Cannabis S. Futura*) opracowano w oparciu o dane literaturowe, wprowadzając modyfikacje dotyczące m.in. wyboru rozpuszczalnika. Za kryterium wyboru metod, warunków i kierunków optymalizacji procesów przez autorów publikacji, na które powołano się w dalszej części, wybrano otrzymanie jak największej zawartości ogólnej związków polifenolowych. Poniżej zamieszczono opis wykorzystanych metod.

Metoda ekstrakcji Soxhleta

Do ekstrakcji metodą Soxhleta wykorzystano protokół opisany przez Karami i in., (2015) z modyfikacjami. Odważony, rozdrobniony i wysuszony materiał roślinny o masie 10 g umieszczono w gilzie a następnie wprowadzono do kolumny ekstrakcyjnej. Jako

rozpuszczalniki ekstrakcyjne zastosowano heksan oraz metanol, które wprowadzano do kolby kulistej w ilości 250 ml. Ekstrakcję prowadzono z wykorzystaniem dwóch rozpuszczalników: metanolu i heksanu. Kolbę z rozpuszczalnikiem ogrzewano w łaźni wodnej doprowadzając rozpuszczalniki do wrzenia (68,7°C i 64,7°C odpowiednio dla heksanu i metanolu). Ekstrakcję prowadzono przez 6h. Po zakończeniu ekstrakcji roztwór pozostawiono do ochłodzenia, a następnie zlewano do probówki wirówkowej typu Falcon (50 ml) i przechowywano w temperaturze -20°C do dalszej analizy.

Metoda ekstrakcji w łaźni ultradźwiękowej (UAE Ultrasound assisted extraction)

Ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami przeprowadzono według zmodyfikowanej metody Hossain i in., (2012) w łaźni ultradźwiękowej „Elmasoic P”. Wysuszony i rozdrobniony materiał roślinny odważono po 10 g, umieszczono w naczyniu ekstrakcyjnym i zalano 50 ml mieszaniny ekstrakcyjnej w trzech wariantach (wodą destylowaną; mieszaniną wody destylowanej i metanolu w proporcji 1:1; metanol). Naczynia umieszczono następnie w łaźni i ekstrahowano w temperaturze 35°C, przy częstotliwości 50 KHz, w trzech cyklach po 15 minut. Każdorazowo po zakończonym cyklu dolewano kolejną porcję 50 ml mieszaniny ekstrakcyjnej. Po zakończonym procesie ekstrakty zostały odsączone pod zwiększonym ciśnieniem na lejku Buchnera z pozostałości stałego materiału roślinnego, zebrane do probówki wirówkowej typu Falcon (50 ml) i przechowywane w temperaturze -20°C do dalszej analizy.

Metoda ekstrakcji gazem w stanie nadkrytycznym

Ekstrakcję przy użyciu układu ekstrakcji płynem nadkrytycznym, SC-CO₂, przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną przez Uwineza i in. (2021) oraz zoptymalizowaną przez Zitek i in. (2021). Zmielone i wysuszone rośliny odważono po 10 g i umieszczono w naczyniu ekstrakcyjnym o pojemności 25 ml a następnie ekstrahowano w temperaturze 50°C przy stałym ciśnieniu 250 barów. Szybkość przepływu CO₂ ustawiono na poziomie 4 ml/min, a jako współrozpuszczalnik zastosowano 1 ml/min metanolu (o czystości 99,5%). Proces ekstrakcji rozpoczynał się automatycznie po osiągnięciu przez system ustalonych warunków i trwał 180 min w każdym przebiegu eksperymentu, na który składały się trzy fazy: pierwszy czas dynamiczny – 45 min, czas statyczny – 15 min i drugi czas dynamiczny – 120 min. Ekstrakty roślinne zebrano w kolbach umieszczonych w module do zbierania frakcji, przelano

do probówek wirówkowych typu Eppendorf (50 ml) i przechowywano w temperaturze -20°C do dalszej analizy.

Metoda ekstrakcji z parą wodną

Ekstrakcję z parą wodną przeprowadzono według Castillo-Herrera, G. A. (2007). Do procesu wykorzystano wysuszony i rozdrobniony materiał roślinny o masie równej 25 g. Susz umieszczono w kolbie dwuszyjnej okrągłodennej i zalano wodą destylowaną w ilości 200 ml. Kolbę z materiałem roślinnym i wodą ogrzewano do wrzenia. Proces prowadzono przez 2,5h, w międzyczasie uzupełniając wodę destylowaną w kolbie. Po wystudzeniu produktu destylacji zawartość kolby przeniesiono do nowego wkraplacza i zalano 100 ml chloroformu. Następnie zawartość wkraplacza wytrząsano aby na dalszym etapie dolną fazę przenieść do czystej kolby. Procedurę wytrząsania z chloroformem powtórzono dwukrotnie. Zawartość kolby destylacyjnej przelano do probówki wirówkowej typu Falcon (3 ml) przechowywano w temperaturze -20°C do dalszych badań.

Przygotowanie ekstraktów do badań

Pozyskane ekstrakty roślinne każdorazowo poddane zostały odparowaniu rozpuszczalnika przy użyciu wyparki rotacyjnej. Pozostałość po odparowaniu zważono a następnie rozpuszczono w dwóch rozpuszczalnikach (metanolu i DMSO), doprowadzając do stężenia na poziomie 16 mg ekstraktu/1 ml rozpuszczalnika. Ekstrakt metanolowy wykorzystano do oznaczenia całkowitej zawartości związków polifenolowych, natomiast z uwagi na wysoką lotność oraz toksyczność tego rozpuszczalnika, a także metodykę badań mikrobiologicznych, do badań właściwości przeciwdrobnoustrojowych oraz antybiofilmowych wykorzystano ekstrakty rozpuszczone w DMSO.

W przypadku ekstraktów i olejków handlowych niemożliwe było oznaczenie stężenia samego ekstraktu roślinnego, przez co w analizie przyjęto, że substancje roślinne wraz z rozpuszczalnikiem traktowane będą jako 100% stężenie. Ekstrakty handlowe przebadano w celach pilotażowych, nie oznaczano zawartości związków polifenolowych a jedynie właściwości przeciwdrobnoustrojowe i antybiofilmowe.

5.3. Oznaczenie całkowitej zawartości związków polifenolowych

Całkowitą zawartość polifenoli (TP) w badanych ekstraktach roślinnych oznaczono metodą z zastosowaniem odczynnika Folina-Ciocalteu, zgodnie z wymaganiami normy ISO 14502-

1:2005 (ISO 14502-1:2005). Głównym założeniem metody jest wykorzystanie zdolności związków polifenolowych do tworzenia barwnej reakcji z odczynnikiem Folina-Ciocalteu. Metoda polega na pomiarze absorbancji kompleksu powstałego na skutek redukcji soli heteropolikwasów fosforowolframomolibdenowych, zawartych w odczynniku Folina-Ciocalteu. Obecne w próbce związki fenolowe ulegają utlenieniu, natomiast sole kwasów fosfomolibdenowego i fosfowolframowego redukcji w środowisku zasadowym, co skutkuje powstaniem produktu reakcji o charakterystycznej, niebieskiej barwie. W celu przeprowadzenia analizy 0,5 ml przygotowanej próbki ekstraktu lub olejku roślinnego rozpuszczonego uprzednio w metanolu dodawano do mieszaniny zawierającej 2,5 ml 10% odczynnika Folina-Ciocalteu z 2 ml 7,5% Na₂CO₃. Po upływie 1h zmierzono absorbancję roztworu przy długości fali 765 nm. Uzyskane wartości absorbancji przyrównano do krzywej wzorcowej o równaniu:

$$y = 0,11745x + 0,1765$$

$$(R^2 = 0,995).$$

Wyniki oznaczeń przedstawiono jako ilość równoważnika kwasu galusowego w 1 g suszu roślinnego użytego do pozyskania ekstraktu (mg GAE/1 g s.m.).

5.4. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe ekstraktów

W niniejszej pracy doktorskiej oznaczono potencjał przeciwdrobnoustrojowy handlowych olejków oraz ekstraktów roślinnych, a także ekstraktów roślinnych pozyskanych samodzielnie w warunkach laboratoryjnych. W ramach oznaczeń określono minimalne stężenie hamujące ekstraktów roślinnych lub procentowe zahamowanie wzrostu, a także ich właściwości antybiofilmowe. Opracowane formułacje środka dezynfekującego zostały również poddane ocenie skuteczności według normy PN-EN 13697+A1:2015.

5.4.1. Oznaczenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) ekstraktów roślinnych

MIC (z ang.: *Minimal Inhibitory Concentration*) badanych ekstraktów i olejków oznaczono metodą seryjnych rozcieńczeń na mikropłytkach opisaną przez Gwiazdowski i in. (2018). Rozcieńczenia ekstraktów przygotowano w 96-studzienkowych mikropłytkach wykonanych ze stali nierdzewnej oraz tworzywa sztucznego HD-PE. W tym celu do każdej studzienki wprowadzano 80 µl pożywki MHB (z ang.: Mueller-Hinton Broth). Do pierwszej studzienki wprowadzano badany ekstrakt lub olejek w ilości 80 µl, mieszano i przenoszono do kolejnej

studzienki. Powtarzając czynność uzyskano serię dwukrotnych rozcieńczeń badanego roztworu. Końcowe stężenie badanych ekstraktów ustalono w przedziale 0,04–8 mg/ml. Stężenie DMSO w próbach kontrolnych ustalono w zakresie 0,2–25%. Po seryjnym rozcieńczeniu ekstraktów w studzienkach, do każdej z nich dodano 80 µl roztworu mikroorganizmów. Roztwory mikroorganizmów przygotowywano w pożywce MHB ustalając gęstość roztworu w densytometrze na poziomie 0,5 w skali MacFarlanda. Płytki zaszczerpione bakteriami przykryto i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 30°C lub 37°C, w zależności od mikroorganizmu. Jako kontrolę negatywną zastosowano pożywki hodowlane zawierające ekstrakty roślinne bez inokulum drobnoustrojów, natomiast czyste kultury bakterii bez ekstraktów zastosowano jako kontrolę pozytywną. Po inkubacji zbadano absorbancję próbek bakterii przy długości fali 600 nm używając czytnika mikropłytek BioTek Epoch 2. Wartość MIC zdefiniowano jako najniższe stężenie ekstraktu, którego użycie skutkowało co najmniej 90% zahamowaniem wzrostu. Eksperyment przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach. W przypadku handlowych olejków i ekstraktów wartość MIC przedstawiono jako procentowe zahamowanie wzrostu, bez wskazywania stężeń hamujących.

5.4.2. Właściwości antybiofilmowe ekstraktów

Opis metodyki badania właściwości antybiofilmowych substancji roślinnych podzielono na części odwzorowujące poszczególne etapy postępowania we właściwej kolejności: formowanie biofilmu; oznaczanie własności antybiofilmowych substancji roślinnych jako czynnik zapobiegający formowaniu oraz jako czynnik usuwający biofilm; ilościowe oznaczanie biofilmu.

Formowanie biofilmu

Doświadczenia dotyczące tworzenia biofilmu przez wybrane bakterie: *P. aeruginosa*, *S. enteritidis* i *L. monocytogenes* przeprowadzono według zmodyfikowanej metody opisanej przez Somrani (2020). Na pożywkach płynnych, dobranych odpowiednio dla poszczególnych mikroorganizmów, przygotowano standaryzowane hodowle bakterii o stężeniu 10^6 CFU/ml. Następnie, tak przygotowane zawiesiny bakterii, w objętości 150 µl wprowadzano do każdej studzienki 48-dołkowej mikropłytki płaskodennej i inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Po inkubacji zawiesiny bakterii ostrożnie usunięto z płytki, a studzienki przepłukano trzykrotnie wodą, aby usunąć nieadherentne komórki i pozostałości pożywki. Po

usunięciu ostatnich pozostałości wody po płukaniu, płytki suszono na powietrzu przez 2 godziny, do całkowitego wyschnięcia. Badania przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

Oznaczanie właściwości antybiofilmowych badanych ekstraktów (formowanie i usuwanie)

Aktywność antybiofilmową ekstraktów roślinnych badano w dwóch kierunkach: jako czynnik zapobiegający tworzeniu się biofilmu i jako czynnik usuwający biofilm. W pierwszym przypadku ekstrakty dodawano do studzienek przed inkubacją drobnoustrojów, natomiast w drugim przypadku ekstrakty stosowano po utworzeniu się biofilmów, w celu ich usunięcia.

Aby określić efekt testowanego ekstraktu lub formułacji proponowanego środka dezynfekującego na zdolność tworzenia biofilmów bakteryjnych, przygotowano roztwory ekstraktów roślinnych. Do każdej studzienki płaskodennej 48-dołkowej płytki dodano 150 μ l ekstraktu oraz 150 μ l zawiesiny bakteryjnej przygotowanej jak opisano w punkcie dotyczącym formowania biofilmu. Płytki inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Końcowe stężenia badanych ekstraktów były równe wartościom 0,5*MIC, 1*MIC oraz 2*MIC. Jako kontrolę ujemną zastosowano DMSO. Po inkubacji zawiesinę bakteryjną usunięto z płytek i studzienki przepłukano trzykrotnie wodą. Płytki suszono następnie na powietrzu przez 2 godziny.

Określenie wpływu badanych ekstraktów roślinnych oraz formułacji opracowanego środka dezynfekującego na usuwanie komórek dojrzałego biofilmu, badano przez dodanie 150 μ l wody i 150 μ l zawiesiny bakteryjnej w każdym dołku i inkubację przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Następnie, po przepłukaniu wodą i wysuszeniu na powietrzu, biofilm przemywano trzykrotnie 300 μ l ekstraktu w odpowiednim stężeniu. Po 15 minutach badane substancje usuwano, płytki przemywano wodą i suszono na powietrzu przez 2 godziny.

Barwienie i ilościowe oznaczanie biofilmu

Biomasę biofilmu oznaczono za pomocą zmodyfikowanej metody O'Toole'a (2011) z wykorzystaniem fioletu krystalicznego. Wysuszone płytki z utworzonym biofilmem zalewano 250 μ l 0,1% roztworu fioletu krystalicznego i pozostawiano na 15 minut. Następnie płytki przemywano wodą i suszono przez noc na powietrzu. Po tym czasie, w celu ilościowego oznaczenia biofilmu dodawano 250 μ l 30% kwasu octowego do każdego dołka i pozostawiono w temperaturze pokojowej na 10–15 minut. Zawartość studzienek przenoszono następnie na nową mikropłytkę i oznaczano gęstość optyczną barwnej

mieszaniny powstałej w każdym dołku. Gęstość optyczną oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali 550 nm przy użyciu czytnika mikropłytek BioTek Epoch 2. Jako próbę zerową zastosowano 30% roztwór kwasu octowego w wodzie. Próbki badano równolegle w trzech powtórzeniach powtórzenia. Wyniki wyrażono jako procent hamowania lub usuwania biofilmu.

5.4.3. Ocena skuteczności dezynfekcji proponowanych formulacji według normy

Określenie skuteczności dezynfekcji formulacji opracowanego środka dezynfekującego przeprowadzono metodą standaryzowaną przez PN-EN 13697+A1:2015 z pewnymi modyfikacjami. Modyfikacja dotyczyła wyboru szczepów wskaźnikowych, które wybrano z puli szczepów zakupionych z kolekcji ATCC i przechowywanych w kolekcji laboratorium Katedry Przyrodniczych Podstaw Jakości Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu. Wyniki oceny skuteczności dezynfekcji zaprezentowano w sekcji poświęconej результатам eksperymentów jako pozytywne lub negatywne zakwalifikowanie proponowanej formulacji jako środka do dezynfekcji według normy.

5.5. Opracowanie składu środka dezynfekującego zawierającego pozyskane substancje roślinne

Optymalny skład proponowanego środka dezynfekującego zawierającego zbadane ekstrakty roślinne został wybrany na podstawie podejścia OFAT (One Factor At a Time). Polegało ono na analizowaniu wpływu składu projektowanego preparatu na skuteczność dezynfekcji przy zmianie tylko jednego czynnika, przy pozostawieniu pozostałych niezmiennych. Zmiennymi w procesie były: ekstrakty (*Origanum vulgare*, *Cannabis S. Sativa* i *Cannabis S. Indica*), stężenie ekstraktu (0,5*MIC, 1*MIC i 2*MIC) oraz procentowa zawartość alkoholu etylowego (30%, 40%, 50%). Opracowane w ten sposób kombinacje trzech zmiennych niezależnych przebadano pod kątem skuteczności działania środków dezynfekujących dla przemysłu spożywczego zgodnie z punktem 5.4.3 niniejszej rozprawy doktorskiej.

5.6. Ocena cyklu życia (LCA)

Badanie LCA przeprowadzono metodą zgodną z wytycznymi normy ISO 14040 składającą się z czterech następujących faz, szczegółowo opisanych w dalszym tekście (ISO 14040: 2009 Zarządzanie środowiskowe - Ocena cyklu życia - Zasady i struktura # 4.2).

5.6.1. Określenie celu i zakresu

Zasadniczym celem podjętej analizy LCA (Life Cycle Assessment) była ocena potencjalnego wpływu na środowisko w cyklu życia stworzonych formułacji środków dezynfekujących bazujących na ekstraktach roślinnych i zidentyfikowanie środowiskowych punktów krytycznych. W dalszej kolejności dokonano porównania stworzonych formułacji oraz ich alternatywnych wariantów z preparatami odkażającymi najczęściej stosowanymi w przemyśle spożywczym.

Warianty testowanych formuł środków dezynfekujących różniły się między sobą stężeniem alkoholu etylowego (30% i 50%) oraz metodą otrzymywania ekstraktu roślinnego: ekstrakcja Soxhleta, ekstrakcja w łaźni ultradźwiękowej oraz ekstrakcja w nadkrytycznych CO₂. W przypadku środków dezynfekujących zawierających substancje roślinne pozyskane dwiema pierwszymi metodami wybrano te ekstrahowane czystym metanolem. Środkami dezynfekującymi wybranymi do oceny porównawczej były: podchloryn sodu, kwas nadoctowy (PFA) i kwas nadmrowkowy (PAA). Za wariant bazowy w badaniu wybrano cykl życia formułacji stworzonej na bazie ekstraktu konopnego pozyskanego metodą ekstrakcji Soxhleta, rozpuszczonego w 50% roztworze alkoholu etylowego. Wszystkie analizowane warianty (każdorazowo z podziałem na fazę produkcji oraz użytkowania i utylizacji) zamieszczono w poniższej tabeli 5.4.

Tabela 5.4. Warianty formułacji preparatu dezynfekującego analizowane w ramach oceny cyklu życia

	Metoda otrzymywania/ nazwa środka do dezynfekcji	stężenie alkoholu etylowego
1	Ekstrakcja Soxhleta	30%
2		50%
3	Ekstrakcja w łaźni ultradźwiękowej	30%
4		50%
5	Ekstrakcja w nadkrytycznym CO ₂	30%
6		50%
7	podchloryn sodu	n.d.
8	PFA	n.d.
9	PAA	n.d.

Źródło: opracowanie własne
n.d. – nie dotyczy

Analizę przeprowadzono z uwzględnieniem następujących etapów cyklu życia:

- **produkcja środka dezynfekującego** – etap ten obejmował pozyskanie surowców (kołyska) oraz wytwarzania i transport środka dezynfekującego na bazie proponowanej formulacji;
- **użytkowanie środka dezynfekującego** – obejmował produkcję etanolu (dotyczy tylko formulacji autorskich), produkcję wody (do przygotowania roztworu o zalecanej stężeniu), ale także emisje bezpośrednie (wynikające z ulatniania się do powietrza etanolu, kwasu nadoctowego, kwasu nadmanganowego czy chloru) oraz oczyszczanie ścieków.

System wyrobu obejmował cykl życia zarówno samych środków dezynfekujących, jak i poszczególnych materiałów pomocniczych. Uzyskane wyniki będą się zatem odnosiły do:

- **wydobycia/pozyskania surowców naturalnych**, z których powstają poszczególne środki dezynfekujące (rolnictwo - konopie, sektor wydobywczy - gaz ziemny), energia elektryczna (sektor wydobywczy - węgiel kamienny, gaz ziemny, ropa naftowa), woda (rzeki), bioetanol (rolnictwo - trzcina cukrowa, buraki);
- **przetwarzania i produkcji środków dezynfekujących** (procesy wytwarzania preparatów na bazie konopi w warunkach laboratoryjnych, procesy produkcji rynkowych środków dezynfekujących w skali przemysłowej), generowania energii cieplnej i elektrycznej (działalność elektrowni i ciepłowni), produkcji wody kranowej (działalność firm wodociągowych), produkcji etanolu,
- **transport środków dezynfekujących na rynek** (cykl życia paliwa oraz cykl życia samochodu),
- **użytkowanie** (dezynfekcja i koniec życia - emisje podczas dezynfekcji, oczyszczenia ścieków).

Funkcją analizowanych produktów była chemiczna dezynfekcja powierzchni rozumiana jako skuteczna dezynfekcja powierzchni abiotycznych według normy PN-EN 13697+A1:2015. Jako jednostkę funkcjonalną (JF) przyjęto **zdezynfekowanie 1 m² powierzchni**. Na podstawie instrukcji stosowania oraz kart charakterystyki rynkowych środków dezynfekujących określono następujące strumienie odniesienia (ilości wyrobów potrzebne do realizacji jednostki funkcjonalnej):

- Środek na bazie konopi, ekstrakcja w nadkrytycznym CO₂, etanol 30% – 0,25 g ekstraktu, 0,1136 g etanolu, 336 g wody;

- Środek na bazie konopi, ekstrakcja w nadkrytycznym CO₂, etanol 50% – 0,25 g ekstraktu, 0,18936 g etanolu, 240 g wody;
- Środek na bazie konopi, ekstrakcja w łaźni ultradźwiękowej, etanol 30% – 8 g ekstraktu, 0,1136 g etanolu, 336 g wody;
- Środek na bazie konopi, ekstrakcja w łaźni ultradźwiękowej, etanol 50% – 8 g ekstraktu, 0,18936 g etanolu, 240 g wody;
- Środek na bazie konopi, ekstrakcja Soxhleta, etanol 30% – 8 g ekstraktu, 0,1136 g etanolu, 336 g wody;
- Środek na bazie konopi, ekstrakcja Soxhleta, etanol 50% – 8 g ekstraktu, 0,18936 g etanolu, 240 g wody;
- Podchloryn sodu – 5,55 g preparatu; 494,45 g wody;
- Kwas nadoctowy (PFA) - 3,5 g preparatu; 496,5 g wody;
- Kwas nadmrowkowy (PAA) - 5,55 g preparatu; 494,45 g wody.

5.6.2. Analiza zbioru wejść i wyjść

Inwentaryzacji wejść i wyjść dokonano przy użyciu danych pochodzących z dwóch źródeł:

- Danych pierwotnych – obejmowały informacje o rodzaju i zużyciu materiałów oraz energii potrzebnych do uzyskania w warunkach laboratoryjnych środków dezynfekujących na bazie konopi;
- Danych wtórnych – obejmowały informacje pobrane z publikacji (Rodon, 2017), z bazy danych ecoinvent 3.8 oraz z kart charakterystyki rynkowych środków dezynfekujących.

Ze względu na różnice w źródłach danych (pierwotne, wtórne), w jakości danych (własne pomiary vs uśrednione dane wtórne) oraz w skali produkcji (laboratoryjna vs przemysłowa), uzyskane wyniki porównawcze należy traktować szacunkowo.

5.6.3. Ocena wpływu na środowisko

Oceny wpływu na środowisko dokonano przy użyciu metody EF 3.0 method (adapted). Stanowi ona zaadaptowaną do potrzeb programu SimaPro wersję metody EF 3.0 method, która została opracowana przez Wspólne Centrum Badawcze Komisji Europejskiej (JRC, Joint Research Centre) w ramach projektu dotyczącego śladów środowiskowych i opublikowana w fazie przejściowej tego projektu (Komisja Europejska – zalecenia, 2021). Przy użyciu tej

metody możliwe jest ilościowe określenie wpływu na środowisko w ramach 16 kategorii wpływu (kategoria wpływu to „klasa reprezentująca rozpatrywane kwestie środowiskowe, do których mogą być przypisane wyniki analizy zbioru wejść i wyjść cyklu życia” ISO 14040:2009 # 3.39). Wykaz kategorii wpływu zaprezentowano w tabeli 5.5.

Tabela 5.5. Kategorie wpływu w metodzie EF 3.0

Kategoria oddziaływania śladu węglowego	Wskaźnik kategorii oddziaływania	Jednostka
Zmiana klimatu ogółem	współczynnik globalnego ocieplenia (GWP100)	kilogram ekwiwalentu CO ₂
Zubożenie warstwy ozonowej	potencjał niszczenia ozonu (ODP)	kilogram ekwiwalentu CFC-11
Działanie toksyczne dla ludzi - rakotwórcze	porównawcza jednostka toksyczności dotycząca ludzi (CTUh)	CTUh
Działanie toksyczne dla ludzi - inne niż rakotwórcze	porównawcza jednostka toksyczności dotycząca ludzi (CTUh)	CTUh
Cząstki stałe	wpływ na zdrowie ludzi	Zachorowalność
Promieniowanie jonizujące, zdrowie człowieka	skuteczność narażenia ludzi dotycząca U235	kilobekerel ekwiwalentu U235
Fotochemiczne powstawanie ozonu, zdrowie człowieka	wzrost stężenia ozonu w warstwie przyziemnej	kilogram ekwiwalentu NMLZO
Zakwaszenie	skumulowane przekroczenie	ekwiwalent mola H ⁺
Eutrofizacja lądowa	skumulowane przekroczenie	ekwiwalent mola N
Eutrofizacja wód słodkich	frakcja substancji biogennej docierająca do wód słodkich (P)	kg ekwiwalentu P
Eutrofizacja wód morskich	frakcja substancji biogennej docierająca do wód morskich (N)	kg ekwiwalentu N
Ekotoksyczność dla wody słodkiej	porównawcza jednostka toksyczności w przypadku ekosystemów (CTUe)	CTUe
Użytkowanie gruntów	Wskaźnik jakości gleby	Wielkość bezwymiarowa (pt)
Zużycie wody	potencjał pozbawienia użytkownika wody (zużycie wody ważone pozbawieniem)	ekwiwalent ilości dostępnej wody po odjęciu zapotrzebowania w m ³
Wykorzystywanie zasobów, minerały i metale	zubożenie zasobów abiotycznych (końcowe zasoby ADP)	kg ekwiwalentu Sb
Wykorzystywanie zasobów, surowce kopalne	Zubożenie zasobów abiotycznych – paliwa kopalne (ADP – surowce kopalne)	megadżul

Źródło: opracowanie własne na podstawie na podstawie zaleceń komisji (UE) 2021/2279z dnia 15 grudnia 2021 r. w sprawie stosowania metod oznaczania śladu środowiskowego do pomiaru efektywności środowiskowej w cyklu życia produktów i organizacji oraz informowania o niej

W tabeli 5.5. wykazano jednostki odnoszące się do tzw. charakteryzowanych wyników LCIA. W dalszej części pracy, oprócz wyników charakteryzowanych, dla cyklu życia poszczególnych formacji i środków dezynfekujących zostanie także zaprezentowany skumulowany pojedynczy ekowskażnik tzw. single score. Jest to wynik uzyskiwany na poziomie ważonych wyników LCIA i wyrażony będzie w punktach (Pt). Bez względu na poziom wyników LCIA, zawsze obowiązuje ta sama zasada interpretacyjna - im wyższy dodatni wynik wskaźnika, tym gorzej, bowiem oznacza to większe negatywne potencjalne oddziaływanie na środowisko.

5.6.4. Interpretacja wyników

Uzyskane wyniki poddane zostały interpretacji. Wykorzystano procedurę identyfikacji znaczących kwestii opracowaną przez JRC na potrzeby metodyki śladów środowiskowych produktów i organizacji (Komisja Europejska, 2021). W pewnym uproszczeniu, procedura ta obejmowała następujące kroki:

- **Krok 1. Identyfikacje znaczących kategorii wpływu** – obejmuje te **kategorie wpływu**, które łącznie odpowiedzialne są za co najmniej 80% oddziaływania wyrażonego w postaci skumulowanego ekowskażnika (identyfikacja oparta na ważonych wynikach LCIA, wszystkie kategorie wpływu uwzględnione);
- **Krok 2. Identyfikacja znaczących etapów cyklu życia** - obejmuje te **etapy**, które łącznie odpowiedzialne są za co najmniej 80% oddziaływania w ramach każdej z zidentyfikowanych w kroku 1 znaczących kategorii wpływu (identyfikacja oparta na charakteryzowanych wynikach LCIA, tylko znaczące kategorie wpływu uwzględnione). W przypadku, gdy udział etapu użytkowania wynosi powyżej 50%, należy oddzielić użytkowanie od pozostałych etapów i dokonać ponownie identyfikacji;
- **Krok 3. Identyfikacja znaczących procesów** - obejmuje te **procesy**, które łącznie odpowiedzialne są za co najmniej 80% oddziaływania w ramach każdej z zidentyfikowanych w kroku 1 znaczących kategorii wpływu (identyfikacja oparta na charakteryzowanych wynikach LCIA, tylko znaczące kategorie wpływu uwzględnione);
- **Krok 4. Identyfikacja znaczących strumieni elementarnych** - obejmuje te **strumienie**, które łącznie odpowiedzialne są za co najmniej 80% oddziaływania w ramach każdej z zidentyfikowanych w kroku 1 znaczących kategorii wpływu (identyfikacja oparta na charakteryzowanych wynikach LCIA, tylko znaczące kategorie wpływu uwzględnione).

W celu uzyskania dodatkowych informacji, podjęto decyzję o zróżnicowaniu scenariuszy dla formułacji autorskich. Parametrami różnicującymi były nie tylko wspomniane wcześniej rodzaje ekstrakcji (Soxhleta, w nadkrytycznym CO₂, w łaźni ultradźwiękowej), stężenie etanolu (30%, 50%), ale także rodzaj energii pokrywającej zapotrzebowanie energetyczne procesu wytwarzania preparatów w laboratorium (przeciętny miks energetyczny dla Polski, energia wiatrowa, energia fotowoltaiczna) oraz pochodzenie etanolu (buraki cukrowe, trzcina cukrowa).

5.7. Analiza statystyczna wyników badań

Wszystkie analizy przeprowadzono w trzech powtórzeniach, a wyniki wyrażono jako średnie ± odchylenie standardowe. Jednokierunkową analizę wariancji (ANOVA) i test Tukeya przeprowadzono przy użyciu oprogramowania SPSS Statistics 25 (SPSS for Mac IOS: IBM SPSS Inc., USA) w celu określenia różnic między próbkami przy $p < 0,05$.

6. Wyniki i dyskusja

6.1 Właściwości przeciwdrobnoustrojowe handlowych olejków i ekstraktów roślinnych

Pierwszym etapem badań realizowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej było określenie właściwości przeciwdrobnoustrojowych handlowych olejków i ekstraktów roślinnych. Badanie potraktowano jako pilotaż wskazujący potencjał substancji roślinnych w hamowaniu wzrostu wybranych mikroorganizmów patogennych. Ocenie poddano łącznie 12 różnych olejków i ekstraktów roślinnych, różniących się sposobem otrzymywania (ekstrakcja CO₂ lub hydrodestylacja), których spis wraz z nazwami rodzajowymi zamieszczono w rozdziale 5.1. w części metodycznej (Tabela 5.1.).

Dokładne określenie minimalnych stężeń hamujących (MIC) handlowych olejków i ekstraktów roślinnych nie było możliwe z uwagi na fakt, iż producenci nie podali informacji o zawartości substancji biologicznie czynnych w swoich wyrobach. W związku z tym wyniki oddziaływania przeciwdrobnoustrojowego przedstawiono jako procentowe zahamowanie wzrostu poszczególnych bakterii wskaźnikowych w zależności od stężenia procentowego badanego ekstraktu lub olejku. Wyjściowy produkt handlowy potraktowano jako stuprocentowe (100%) stężenie, a zakres stężeń, w którym prowadzono badania, wynosił od 0,4% do 50%. Mikroorganizmy wskaźnikowe do tej części badań wybrano spośród gatunków wymienianych najczęściej jako zagrożenie w przemyśle spożywczym. Wyniki eksperymentu przedstawiono w tabelach 6.1 – 6.10. Kolorem zielonym wskazano zahamowanie wzrostu badanych bakterii na poziomie co najmniej dziewięćdziesięciu procent ($\geq 90\%$), do czego odnosi się zastosowane w opisie wyników sformułowanie „skuteczne zahamowanie wzrostu”.

W tabeli 6.1 przedstawiono wpływ testowanych olejków i ekstraktów na wzrost *B. subtilis*. Jak wynika z danych, 50% roztwory wszystkich badanych substancji hamowały wzrost tego mikroorganizmu w co najmniej dziewięćdziesięciu procentach. Skuteczność zahamowania wzrostu *B. subtilis* przez niższe stężenia zależała natomiast od rodzaju rośliny użytej do produkcji ekstraktu lub olejku, a także od metody jej pozyskania. Najsilniejsze oddziaływanie antybakteryjne względem wykazywały olejki i ekstrakty z oregano oraz konopi, a także ekstrakt CO₂ z kadzidłowca, dla których skuteczne zahamowanie wzrostu *B. subtilis*

obserwowano przy stężeniu 0,4%. Co ciekawe, olejek z kadzidłowca nie był już tak skuteczny jak jego odpowiednik pozyskany metodą ekstrakcji nadkrytycznej (skuteczność hamowania na poziomie 12,5%). Warto jednak podkreślić, że zależność pomiędzy siłą oddziaływania antybakteryjnego a sposobem otrzymywania a nie była obserwowana dla pozostałych handlowych olejków i ekstraktów. W przypadku lawendy i rozmarynu olejki pozyskane metodą hydrodestylacji były skuteczne, odpowiednio, w dwukrotnie i czterokrotnie niższych stężeniach (3,1% vs 6,3% i 1,6% vs 6,3%) w porównaniu z ekstraktami CO₂. Najsilniejszym działaniem antybakteryjnym wobec bakterii *B. subtilis* charakteryzowały się olejki i ekstrakty CO₂ pozyskane z mięty i melisy.

Tabela 6.1. Antybakteryjne oddziaływanie handlowych olejków i ekstraktów CO₂ wobec *B. subtilis* (wyrażone jako procent zahamowania wzrostu)

pochodzenie olejku/ekstraktu		stężenie wybranego olejku/ekstraktu [%]							
		50,0	25,0	12,5	6,3	3,1	1,6	0,8	0,4
Olejek	oregano	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%	100%
	kadzidłowy	100%	100%	100%	65%	80%	86%	89%	85%
	lawendowy	100%	100%	100%	99%	99%	88%	80%	63%
	rozmarynowy	100%	100%	100%	100%	100%	100%	15%	0%
	konopny (CBD)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	92%
	mięta	100%	80%	63%	26%	15%	30%	12%	0%
	melisa	100%	60%	59%	12%	5%	5%	0%	0%
Ekstrakt CO ₂	oregano	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	98%
	kadzidłowy	100%	100%	100%	100%	94%	91%	94%	91%
	lawendowy	100%	100%	100%	100%	60%	59%	19%	24%
	rozmarynowy	100%	100%	98%	91%	85%	72%	60%	26%
	konopny (CBD)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	94%
	mięta	95%	88%	81%	74%	41%	12%	0%	0%
	melisa	91%	79%	74%	64%	28%	0%	0%	0%

Wyniki procentowego zahamowania wzrostu są średnią z trzech równoległych oznaczeń, zaokrągloną do jedności

Źródło: opracowanie własne na podstawie badań

Podobne oddziaływanie badanych olejków i ekstraktów obserwowano względem bakterii z gatunku *S. aureus* (tabela 6.2.). Najsilniejszą aktywnością antybakteryjną charakteryzowały się związki pozyskane z roślin oregano i konopi, hamując skutecznie wzrost badanego mikroorganizmu nawet w najniższym z badanych stężeń (0,4%). Silne oddziaływanie wykazywał również olejek z rozmarynu oraz ekstrakt z lawendy, skutecznie hamując wzrost bakterii *S. aureus* w stężeniu 1,6%. Znacznie niższą wrażliwość badanego mikroorganizmu obserwowano na działanie olejku i ekstraktu z kadzidłowca (stężenie hamujące na poziomie $\geq 90\%$ wynosiło odpowiednio: 12,5% i 25%). W przypadku lawendy, silniejsze działanie

wykazywał ekstrakt CO₂, który hamował skutecznie wzrost *S. aureus* w dwukrotnie niższym stężeniu niż olejek pozyskany metodą hydrodestylacji (1,6% vs 3,1%), podczas gdy w przypadku rozmarynu silniejsze działanie wykazał olejek, hamujący wzrost bakterii w czterokrotnie niższym stężeniu (olejek 1,6% vs ekstrakt 6,3%). Najłabsze oddziaływanie względem *S. aureus*, podobnie jak w odniesieniu do *B. subtilis*, wykazywały olejki i ekstrakty CO₂ z melisy i mięty. Olejek pozyskany z mięty skutecznie hamował wzrost omawianego mikroorganizmu w stężeniu 25% w przeciwieństwie do olejku z melisy, który w najwyższym badanym stężeniu (50%) hamował wzrost bakterii w mniej niż dziewięćdziesięciu procentach. Ekstrakty CO₂ z mięty i melisy były skuteczne jedynie w najwyższym badanych stężeniu.

Tabela 6.2. Antybakteryjne oddziaływanie handlowych olejków i ekstraktów CO₂ wobec *S. aureus* (wyrażone jako procent zahamowania wzrostu)

pochodzenie olejku/ekstraktu		stężenie wybranego olejku/ekstraktu [%]							
		50,0	25,0	12,5	6,3	3,1	1,6	0,8	0,4
Olejek	oregano	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	kadziłtowy	100%	100%	100%	70%	43%	0%	0%	0%
	lawendowy	100%	100%	93%	91%	90%	84%	56%	21%
	rozmarynowy	100%	100%	100%	100%	100%	100%	64%	0%
	konopny (CBD)	100%	100%	100%	100%	100%	98%	94%	92%
	mięta	100%	91%	84%	63%	54%	32%	11%	0%
	melisa	86%	36%	21%	12%	4%	2%	0%	0%
Ekstrakt CO ₂	oregano	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%
	kadziłtowy	100%	100%	72%	70%	41%	0%	0%	0%
	lawendowy	100%	100%	100%	100%	99%	99%	0%	0%
	rozmarynowy	100%	100%	100%	97%	88%	84%	72%	73%
	konopny (CBD)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	94%	91%
	mięta	95%	84%	81%	73%	55%	34%	21%	0%
	melisa	91%	78%	71%	31%	19%	0%	0%	0%

Wyniki procentowego zahamowania wzrostu są średnią z trzech równoległych oznaczeń, zaokrągloną do jedności

Źródło: opracowanie własne na podstawie badań

Wyniki zamieszczone w tabeli 6.3., dotyczące hamowania wzrostu bakterii z gatunku *C. perfringens* wskazują, iż najsilniejsze działanie względem tego mikroorganizmu wykazały ekstrakty CO₂ i olejki z oregano i konopi (skuteczne hamowanie obserwowano już w stężeniu 0,4%). Podobnie, silne działanie odnotowano dla ekstraktu CO₂ z kadziłłowca, który hamował całkowicie wzrost bakterii w najniższym stosowanym stężeniu, podczas gdy olejek z tej rośliny wykazywał skuteczne działanie dopiero w stężeniu 12,5%. Silne oddziaływanie

antybakteryjne względem *C. perfringens* (ponad 90% zahamowanie wzrostu) wykazały także olejki z rozmarynu i lawendy w stężeniu 3,1%, natomiast ekstrakty CO₂ z tych roślin były skuteczne dopiero w czterokrotnie wyższym stężeniu (12,5%). Najniższą aktywność antybakteryjną wykazały olejki i ekstrakty pozyskane z melisy i mięty, które skutecznie hamowały wzrost *C. perfringens* w zakresie stężeń 25 – 50%.

Tabela 6.3. Antybakteryjne oddziaływanie handlowych olejków i ekstraktów CO₂ wobec *C. perfringens* (wyrażone jako procent zahamowania wzrostu)

pochodzenie olejku/ekstraktu		stężenie wybranego olejku/ekstraktu [%]							
		50,0	25,0	12,5	6,3	3,1	1,6	0,8	0,4
Olejek	oregano	100%	100%	100%	100%	100%	92%	90%	91%
	kadziłtowy	100%	100%	96%	86%	70%	45%	17%	11%
	lawendowy	100%	94%	99%	98%	98%	69%	14%	14%
	rozmarynowy	100%	100%	100%	100%	100%	72%	67%	42%
	konopny (CBD)	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	94%
	mięta	100%	90%	71%	44%	32%	20%	7%	2%
	melisa	100%	80%	61%	25%	19%	7%	0%	0%
Ekstrakt CO ₂	oregano	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	kadziłtowy	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	lawendowy	100%	100%	100%	89%	18%	17%	12%	12%
	rozmarynowy	100%	100%	93%	82%	71%	21%	2%	0%
	konopny (CBD)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	94%	92%
	mięta	100%	91%	71%	66%	44%	38%	24%	7%
	melisa	100%	98%	83%	62%	41%	18%	2%	0%

Wyniki procentowego zahamowania wzrostu są średnią z trzech równoległych oznaczeń, zaokrągloną do jedności

Źródło: opracowanie własne na podstawie badań

Olejki z oregano i konopi oraz ekstrakty CO₂ z tych roślin, jak również ekstrakt z kadziłłowca, najsilniej spośród badanych związków hamowały wzrost bakterii *L. monocytogenes* (tabela 6.4.). Podobnie, jak w odniesieniu do *B. subtilis* i *S. aureus*, hamowanie wzrostu przekraczające 90% obserwowano w całym badanych zakresie stężeń. Olejek lawendowy i rozmarynowy skutecznie hamowały wzrost bakterii *L. monocytogenes* w stężeniu 3,1%, co stanowiło odpowiednio: dwukrotnie i czterokrotnie niższe stężenie niż w przypadku ekstraktów CO₂ z tych roślin. Nieco słabsze działanie wykazał olejek z kadziłłowca, hamujący wzrost mikroorganizmu na poziomie $\geq 90\%$ w stężeniu 12,5%, co stanowiło trzydziestodwu-krotnie wyższe stężenie w porównaniu z ekstraktem z tej rośliny. Z kolei olejki i ekstrakty CO₂ z melisy i mięty nie wykazywały skutecznej aktywności

antybakteryjnej względem *L. monocytogenes* (hamowanie wzrostu bakterii na poziomie poniżej 90%).

Tabela 6.4. Antybakteryjne oddziaływanie handlowych olejków i ekstraktów CO₂ wobec *L. monocytogenes* (wyrażone jako procent zahamowania wzrostu)

pochodzenie olejku/ekstraktu		stężenie wybranego olejku/ekstraktu [%]							
		50,0	25,0	12,5	6,3	3,1	1,6	0,8	0,4
Olejek	oregano	100%	100%	100%	100%	92%	91%	90%	90%
	kadziłowy	100%	100%	96%	86%	70%	45%	17%	11%
	lawendowy	100%	94%	99%	98%	98%	69%	14%	14%
	rozmarynowy	100%	100%	100%	100%	100%	72%	67%	42%
	konopny (CBD)	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	94%
	mięta	81%	74%	52%	44%	31%	12%	2%	0%
	melisa	67%	21%	21%	18%	14%	2%	0%	0%
Ekstrakt CO ₂	oregano	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	kadziłowy	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	lawendowy	100%	100%	100%	93%	18%	17%	12%	12%
	rozmarynowy	100%	100%	93%	82%	71%	21%	2%	0%
	konopny (CBD)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	94%	92%
	mięta	81%	74%	51%	50%	40%	38%	24%	11%
	melisa	64%	55%	41%	12%	0%	0%	0%	0%

Wyniki procentowego zahamowania wzrostu są średnią z trzech równoległych oznaczeń, zaokrągloną do jedności

Źródło: opracowanie własne na podstawie badań

Wzrost bakterii *E. faecalis* był skutecznie hamowany w całym badanym zakresie stężeń (0,4% - 50%) przez olejki i ekstrakty CO₂ z oregano i konopi (tabela 6.5.). Wysoką wrażliwość mikroorganizm ten wykazywał na działanie olejku lawendowego, który skutecznie hamował wzrost patogenu w stężeniu 0,8%. Ekstrakt z lawendy hamował wzrost bakterii na poziomie $\geq 90\%$ dopiero w stężeniu 6,3%, a więc ośmiokrotnie wyższym. Podobną aktywność antybakteryjną odnotowano dla olejku i ekstraktu z kadziłowca, które hamowały wzrost *E. faecalis* na poziomie $\geq 90\%$ w stężeniu 6,3%. Z kolei olejek i ekstrakt z rozmarynu wykazały taką aktywność w stężeniu 12,5%. Podobnie, jak w przypadku omawianych wcześniej mikroorganizmów, najmniejszą wrażliwość bakterie *E. faecalis* wykazały na działanie olejku i ekstraktu CO₂ z mięty i melisy, które skutecznie hamowały wzrost w stężeniu: 50% (olejki i ekstrakt CO₂ z melisy) i 25% (ekstrakt CO₂ z mięty).

Tabela 6.5. Antybakteryjne oddziaływanie handlowych olejków i ekstraktów CO₂ wobec *E. faecalis* (wyrażone jako procent zahamowania wzrostu)

pochodzenie olejku/ekstraktu		stężenie wybranego olejku/ekstraktu [%]							
		50,0	25,0	12,5	6,3	3,1	1,6	0,8	0,4
Olejek	oregano	100%	100%	100%	100%	99%	99%	98%	98%
	kadziłłowy	100%	100%	95%	91%	89%	83%	79%	42%
	lawendowy	100%	100%	98%	97%	94%	93%	91%	87%
	rozmarynowy	100%	100%	100%	77%	42%	11%	4%	3%
	konopny (CBD)	100%	100%	100%	100%	99%	99%	97%	91%
	mięta	100%	84%	71%	65%	45%	11%	3%	1%
	melisa	91%	81%	55%	41%	32%	13%	0%	0%
Ekstrakt CO ₂	oregano	100%	100%	100%	100%	100%	100%	98%	98%
	kadziłłowy	100%	100%	96%	95%	88%	83%	76%	67%
	lawendowy	100%	100%	100%	98%	59%	13%	2%	0%
	rozmarynowy	100%	100%	93%	81%	74%	21%	0%	0%
	konopny (CBD)	100%	100%	100%	100%	99%	98%	91%	90%
	mięta	100%	92%	71%	61%	32%	21%	18%	0%
	melisa	90%	82%	62%	54%	23%	15%	0%	0%

Wyniki procentowego zahamowania wzrostu są średnią z trzech równoległych oznaczeń, zaokrągloną do jedności

Źródło: opracowanie własne na podstawie badań

Tabela 6.6. przedstawia antagonistyczne oddziaływanie olejków i ekstraktów CO₂ względem *M. luteus*, który charakteryzował się największą wrażliwością na badane substancje spośród bakterii Gram-dodatnich. Podobnie, jak w stosunku do pozostałych bakterii z tej grupy, najsilniejsze hamowanie wykazywały olejki i ekstrakty z oregano i konopi, które skutecznie hamowały wzrost *M. luteus* w najniższym badanym stężeniu (0,4%). Olejki z rozmarynu i lawendy były skuteczne w stężeniu 3,1%, a ekstrakty CO₂ z tych roślin odpowiednio w stężeniach: 3,1% i 6,3%. Olejki i ekstrakty CO₂ pozyskane z kadziłłowca skutecznie hamowały wzrost bakterii *M. luteus* w stężeniu 6,3%, niezależnie od metody ich pozyskania. Najsłabsze oddziaływanie wykazywały ekstrakty i olejki z mięty i melisy, które w stężeniu 25% hamowały wzrost mikroorganizmu w ponad dziewięćdziesięciu procentach, przy czym było to oddziaływanie silniejsze niż obserwowane względem pozostałych bakterii Gram-dodatnich.

Tabela 6.6. Antybakteryjne oddziaływanie handlowych olejków i ekstraktów CO₂ wobec *M. luteus* (wyrażone jako procent zahamowania wzrostu)

pochodzenie olejku/ekstraktu		stężenie wybranego olejku/ekstraktu [%]							
		50,0	25,0	12,5	6,3	3,1	1,6	0,8	0,4
Olejek	oregano	100%	100%	100%	100%	99%	97%	97%	96%
	kadziłłowy	100%	100%	100%	100%	59%	21%	0%	0%
	lawendowy	100%	100%	99%	98%	98%	51%	29%	11%
	rozmarynowy	100%	100%	100%	100%	100%	32%	4%	0%
	konopny (CBD)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	97%	94%
	mięta	100%	90%	88%	61%	23%	9%	0%	0%
	melisa	100%	100%	90%	74%	44%	12%	0%	0%
Ekstrakt CO ₂	oregano	100%	100%	100%	100%	100%	99%	98%	97%
	kadziłłowy	100%	100%	95%	96%	71%	35%	26%	18%
	lawendowy	100%	100%	100%	98%	41%	21%	0%	0%
	rozmarynowy	100%	100%	97%	93%	91%	74%	40%	21%
	konopny (CBD)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	94%	90%
	mięta	100%	100%	81%	74%	64%	43%	22%	4%
	melisa	94%	90%	84%	54%	38%	14%	1%	0%

Wyniki procentowego zahamowania wzrostu są średnią z trzech równoległych oznaczeń, zaokrągloną do jedności

Źródło: opracowanie własne na podstawie badań

Oddziaływanie handlowych olejków i ekstraktów CO₂ oceniono również wobec wybranych bakterii Gram-ujemnych, w tym *E. coli*, *C. jejuni*, *S. Enteritidis* i *C. perfringens*. W tabeli 6.7. przedstawiono wyniki aktywności antybakteryjnej względem bakterii *E. coli*. Największą wrażliwość badanego mikroorganizmu odnotowano przy zastosowaniu ekstraktów CO₂ i olejków z oregano i konopi, które hamowały wzrost *E. coli* na poziomie $\geq 90\%$ w całym zakresie stężeń. Olejki i ekstrakty CO₂ z pozostałych roślin charakteryzowały się zdecydowanie słabszym działaniem przeciwdrobnoustrojowym względem bakterii *E. coli*. Ekstrakt CO₂ rozmarynowy skutecznie hamował wzrost patogenu w stężeniu 6,3%, z kadziłłowca w 12,5%, natomiast z lawendy dopiero w stężeniu 25%. Olejki z lawendy i rozmarynu były skuteczne w stężeniu 12,5%, natomiast z kadziłłowca dopiero w stężeniu 25%. Olejki i ekstrakty z mięty, jak również olejek z melisy, skutecznie hamowały wzrost bakterii jedynie w najwyższym badanym stężeniu (50%). Z kolei ekstrakt z melisy nie hamował *E. coli* w badanym zakresie stężeń na poziomie $\geq 90\%$.

Tabela 6.7. Antybakteryjne oddziaływanie handlowych olejków i ekstraktów CO₂ wobec *E. coli* (wyrażone jako procent zahamowania wzrostu)

pochodzenie olejku/ekstraktu		stężenie wybranego olejku/ekstraktu [%]							
		50,0	25,0	12,5	6,3	3,1	1,6	0,8	0,4
Olejek	oregano	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	98%
	kadziłtowy	100%	94%	80%	26%	15%	30%	20%	11%
	lawendowy	98%	96%	95%	89%	79%	61%	51%	33%
	rozmarynowy	100%	100%	97%	48%	46%	31%	15%	0%
	konopny (CBD)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	92%
	mięta	100%	78%	64%	54%	33%	30%	12%	0%
	melisa	91%	55%	59%	12%	4%	2%	0%	0%
Ekstrakt CO ₂	oregano	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	98%
	kadziłtowy	94%	94%	95%	88%	65%	61%	51%	21%
	lawendowy	100%	99%	86%	12%	5%	5%	5%	2%
	rozmarynowy	100%	100%	98%	91%	79%	72%	60%	26%
	konopny (CBD)	100%	100%	100%	100%	100%	99%	98%	91%
	mięta	95%	74%	61%	55%	40%	34%	21%	0%
	melisa	84%	78%	71%	54%	28%	0%	0%	0%

Wyniki procentowego zahamowania wzrostu są średnią z trzech równoległych oznaczeń, zaokrągloną do jedności

Źródło: opracowanie własne na podstawie badań

Z tabeli 6.8. wynika, że bakterie z gatunku *C. jejuni* wykazały największą wrażliwość na olejki i ekstrakty CO₂ z oregano i konopi, które, podobnie jak w omówionych powyżej przypadkach, hamowały wzrost bakterii w całym zakresie badanych stężeń. Silne działanie antybakteryjne stwierdzono również w przypadku olejku i ekstraktu CO₂ z rozmarynu oraz ekstraktu CO₂ z lawendy, które były skuteczne w stężeniu 6,3%, natomiast nieco słabszą aktywność odnotowano dla olejku i ekstraktu CO₂ z kadziłowca oraz olejku z lawendy, które hamowały wzrost *C. jejuni* na poziomie $\geq 90\%$ w stężeniu 12,5%. Badane olejki i ekstrakty handlowe z mięty wykazywały aktywność hamującą wzrost *C. jejuni* na poziomie $\geq 90\%$ jedynie w najwyższym z badanych stężeń (50%), natomiast dla substancji pozyskanych z melisy nie stwierdzono odpowiedniej skuteczności w zakresie badanych stężeń (hamowanie wzrostu *C. jejuni* poniżej 90%).

Tabela 6.8. Antybakteryjne oddziaływanie handlowych olejków i ekstraktów CO₂ wobec *C. jejuni* (wyrażone jako procent zahamowania wzrostu)

pochodzenie olejku/ekstraktu		stężenie wybranego olejku/ekstraktu [%]							
		50,0	25,0	12,5	6,3	3,1	1,6	0,8	0,4
Olejek	oregano	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	kadziłłowy	100%	100%	100%	17%	13%	4%	0%	0%
	lawendowy	100%	100%	98%	22%	9%	0%	0%	0%
	rozmarynowy	100%	100%	100%	100%	7%	5%	0%	0%
	konopny (CBD)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	98%	92%
	mięta	100%	80%	62%	51%	31%	11%	3%	1%
	melisa	71%	62%	49%	41%	31%	20%	7%	0%
Ekstrakt CO ₂	oregano	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	97%
	kadziłłowy	100%	95%	95%	30%	2%	0%	0%	0%
	lawendowy	100%	100%	100%	100%	15%	0%	0%	0%
	rozmarynowy	100%	100%	100%	91%	77%	42%	18%	0%
	konopny (CBD)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	94%
	mięta	91%	74%	62%	41%	12%	0%	0%	0%
	melisa	88%	70%	51%	12%	0%	0%	0%	0%

Wyniki procentowego zahamowania wzrostu są średnią z trzech równoległych oznaczeń, zaokrągloną do jedności

Źródło: opracowanie własne na podstawie badań

Bakterie z rodzaju *Salmonella* okazały się bardziej wrażliwe na działanie testowanych olejków i ekstraktów niż bakterie z gatunków *E. coli* i *C. jejuni* (tabela 6.9.). Bakterie te były hamowane przez olejki i ekstrakty CO₂ z oregano i konopi oraz przez ekstrakt CO₂ z kadziłłowca ze skutecznością wyższą niż 90% w całym badanym zakresie stężeń (0,4% - 50%). Olejek i ekstrakt z lawendy wykazywały skuteczne zahamowanie wzrostu *S. Enteritidis* w stężeniu 6,3%, niezależnie od metody ich pozyskania. Ekstrakt z rozmarynu w stężeniu 6,3% hamował wzrost *S. Enteritidis* ze skutecznością 91%, natomiast olejek rozmarynowy w tym samym stężeniu hamował wzrost badanego mikroorganizmu zaledwie w 39% (skuteczność hamowania wzrostu na poziomie $\geq 90\%$ uzyskano w stężeniu dwukrotnie wyższym – 12,5%). Bakterie *S. Enteritidis* wykazywały natomiast najmniejszą wrażliwość na działanie olejków i ekstraktów CO₂ z mięty i melisy, które hamowały wzrost bakterii, odpowiednio, w stężeniach: 25% (mięta) i 50% (melisa).

Tabela 6.9. Antybakteryjne oddziaływanie handlowych olejków i ekstraktów CO₂ wobec *S. Enteritidis* (wyrażone jako procent zahamowania wzrostu)

pochodzenie olejku/ekstraktu		stężenie wybranego olejku/ekstraktu [%]							
		50,0	25,0	12,5	6,3	3,1	1,6	0,8	0,4
Olejek	oregano	100%	100%	100%	100%	100%	98%	99%	99%
	kadzidłowy	100%	100%	92%	83%	43%	26%	19%	4%
	lawendowy	100%	100%	99%	93%	72%	67%	46%	40%
	rozmarynowy	100%	100%	100%	39%	11%	4%	5%	3%
	konopny (CBD)	100%	100%	100%	100%	100%	99%	98%	91%
	mięta	100%	91%	63%	51%	47%	41%	23%	11%
	melisa	98%	88%	67%	58%	33%	14%	5%	0%
Ekstrakt CO ₂	oregano	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	98%
	kadzidłowy	100%	100%	100%	99%	94%	94%	91%	91%
	lawendowy	100%	100%	100%	100%	59%	41%	24%	19%
	rozmarynowy	100%	100%	100%	91%	77%	42%	18%	0%
	konopny (CBD)	100%	100%	100%	100%	99%	99%	98%	98%
	mięta	100%	98%	74%	45%	16%	1%	1%	0%
	melisa	100%	81%	77%	64%	44%	12%	7%	0%

Wyniki procentowego zahamowania wzrostu są średnią z trzech równoległych oznaczeń, zaokrągloną do jedności

Źródło: opracowanie własne na podstawie badań

Podobnie, jak w przypadku pozostałych bakterii, bakterie *P. aeruginosa* wykazały największą wrażliwość na działanie olejków i ekstraktów CO₂ z oregano i konopi (tabela 6.10.), które hamowały wzrost mikroorganizmu na poziomie $\geq 90\%$ w całym zakresie stężeń. Niemal we wszystkich przypadkach obserwowano niewielkie różnice pomiędzy wynikami procentowego zahamowania wzrostu olejków i ekstraktów CO₂ pozyskanych z poszczególnych roślin. Ustalono w związku z tym jednakowe stężenia skutecznie hamujące wzrost mikroorganizmu dla olejków i ekstraktów CO₂ z lawendy i rozmarynu (6,3%) oraz z mięty (50%). Jedynie w przypadku olejku i ekstraktu CO₂ z kadzidłowca odnotowano różnicę – olejek całkowicie hamował wzrost *P. aeruginosa* w stężeniu 6,3%, natomiast ekstrakt CO₂ hamował wzrost bakterii na poziomie $\geq 90\%$ w stężeniu 12,5%. Najmniejszą wrażliwość bakterie *P. aeruginosa* wykazały na działanie olejku i ekstraktu z melisy, które nawet w stężeniu 50% hamowały wzrost mikroorganizmu na poziomie nieprzekraczającym 90%.

Tabela 6.10. Antybakteryjne oddziaływanie handlowych olejków i ekstraktów CO₂ wobec *P. aeruginosa* (wyrażone jako procent zahamowania wzrostu)

pochodzenie olejku/ekstraktu		stężenie wybranego olejku/ekstraktu [%]							
		50,0	25,0	12,5	6,3	3,1	1,6	0,8	0,4
Olejek	oregano	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%
	kadziłtowy	100%	100%	100%	100%	54%	10%	7%	0%
	lawendowy	100%	100%	99%	96%	31%	11%	6%	0%
	rozmarynowy	100%	100%	100%	100%	10%	8%	7%	0%
	konopny (CBD)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	97%	91%
	mięta	100%	82%	62%	61%	55%	40%	17%	8%
	melisa	82%	68%	41%	12%	2%	0%	0%	0%
Ekstrakt CO ₂	oregano	100%	91%	100%	100%	100%	100%	100%	98%
	kadziłtowy	100%	99%	91%	75%	51%	41%	11%	2%
	lawendowy	100%	100%	100%	97%	30%	11%	0%	0%
	rozmarynowy	100%	100%	100%	91%	77%	42%	18%	0%
	konopny (CBD)	100%	100%	100%	100%	100%	99%	96%	93%
	mięta	100%	61%	50%	41%	22%	9%	1%	0%
	melisa	88%	74%	69%	37%	27%	6%	0%	0%

Wyniki procentowego zahamowania wzrostu są średnią z trzech równoległych oznaczeń, zaokrągloną do jedności

Źródło: opracowanie własne na podstawie badań

Przeprowadzone badania pilotażowe stanowiły potwierdzenie możliwości wykorzystania substancji roślinnych w formie olejków i ekstraktów CO₂ w celu zahamowania wzrostu mikroorganizmów patogennych, typowych dla przemysłu spożywczego. Podsumowując uzyskane wyniki badań właściwości przeciwdrobnoustrojowych można zauważyć zróżnicowane działanie badanych związków, zależne przede wszystkim od ich pochodzenia, ale również metody pozyskania substancji aktywnych. Stwierdzono, że najsilniejszym oddziaływaniem charakteryzowały się roztwory z oregano i konopi, hamujące wzrost wszystkich mikroorganizmów wskaźnikowych już w najniższym zastosowanym stężeniu (0,4%). Warto przy tym zauważyć, że rezultaty te uzyskano niezależnie od metody pozyskiwania substancji biologicznie czynnych. W przypadku czterech badanych gatunków bakterii: *B. subtilis*, *C. perfringens*, *L. monocytogenes* oraz *S. Enteritidis* skuteczne zahamowanie wzrostu ($\geq 90\%$) odnotowano także dla ekstraktu CO₂ pozyskanego z kadziłłowca. Olejek z kadziłłowca pozyskany metodą hydrodestylacji charakteryzował się słabszą aktywnością, hamując wzrost badanych bakterii na poziomie 90% w stężeniach od dwu- do ośmiokrotnie wyższych w porównaniu z ekstraktem, w zależności od

mikroorganizmu wskaźnikowego. Bakterie z gatunku *E. faecalis* jako jedyne były szczególnie wrażliwe na działanie olejku z lawendy, który skutecznie hamował wzrost wspomnianego patogenu w stężeniu 0,8%. W pozostałych przypadkach dla roślin kadzidłowca, lawendy i rozmarynu uzyskiwano podobne wyniki, ustalając stężenia skutecznie hamujące wzrost bakterii na poziomie od 1,6% do 12,5%. Najśłabsze działanie wykazały olejki i ekstrakty CO₂ z melisy i mięty (stężenie skutecznie hamujące uzyskiwano na poziomie od 25%).

Stężenie hamujące wzrost wszystkich dziesięciu bakterii wskaźnikowych w co najmniej 90% ustalono na poziomach: 0,4% dla olejków i ekstraktów CO₂ z oregano i konopi; 6,3% dla olejku lawendowego; 12,5% dla olejków i ekstraktów CO₂ z rozmarynu i kadzidłowca oraz ekstraktu CO₂ lawendowego; >50% dla olejków i ekstraktów CO₂ z mięty i melisy. Uzyskane wyniki nie wskazały jednoznacznie, czy sposób ekstrakcji wpływa na aktywność przeciwdrobnoustrojową. Jedynie w przypadku ekstraktu CO₂ i olejku z kadzidłowca można wskazać na większy potencjał w hamowaniu wzrostu mikroorganizmów na korzyść ekstraktów CO₂.

Przeprowadzone badania pozwoliły wskazać ekstrakty CO₂ i olejki z oregano oraz konopi jako produkty charakteryzujące się najsilniejszym oddziaływaniem antybakteryjnym spośród przebadanych preparatów handlowych. W literaturze naukowej można znaleźć wiele opracowań dotyczących aktywności przeciwdrobnoustrojowej komercyjnych olejków i ekstraktów roślinnych, które potwierdzają ich oddziaływanie, jednakże wyniki podawane są zwykle w jednostkach masowych, a nie procentowych. Przykładowo Van Vuuren i in., (2009) ustalili wartość MIC handlowych olejków eterycznych z rozmarynu na poziomie 6 mg/ml, natomiast z mięty pieprzowej na poziomie 8 mg/ml wobec *S. aureus*. Natomiast Bajera i in., (2017) ustalili wartość MIC olejku rozmarynowego oraz miętowego na poziomie 10 mg/ml wobec *C. perfringens*. W innej pracy naukowej, Van Vuuren i in., (2010) ustalili MIC dla olejków z kadzidłowca w zakresach: 4–16 mg/ml (*S. aureus*); 1.5–8.3 mg/ml (*B. cereus*); 4.0–12.0 mg/ml (*E. coli*); 2.0–12.8 mg/ml (*P. vulgaris*). Badacze Behbahani i Shahidi (2019) ustalili natomiast minimalne stężenie ekstraktów z melisy hamujące wzrost *P. aeruginosa* i *E. coli* na poziomie 4 mg/ml. Z kolei de Rapper i in., (2013) uzyskali wartość MIC =2 mg/ml w stosunku do szczepów *E. faecalis*, *P. aeruginosa* i *S. aureus* dla olejków lawendowych. Należy wziąć pod uwagę, że komercyjne olejki czy ekstrakty CO₂ z tej samej rośliny mogą się między sobą różnić

składem i zawartością poszczególnych substancji, a tym samym wykazywać inny poziom aktywności przeciwdrobnoustrojowej, na co również wskazują niektóre prace.

Co ważne, wyniki procentowego stężenia produktów roślinnych wybranych do eksperymentu nie pozwoliły na dokładne określenie wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) w stężeniu masowym ani objętościowym, tak jak podają to inni badacze w przytoczonych badaniach. Z uwagi na ten fakt podjęto kroki w kierunku samodzielnego pozyskania ekstraktów roślinnych i precyzyjnego określenia ich wartości MIC.

6.2. Właściwości biologiczne otrzymanych ekstraktów

W oparciu o przeprowadzone badania pilotażowe wytypowano kilka roślin o dużym potencjale antybakteryjnym względem mikroorganizmów stanowiących częste zagrożenie w przemyśle spożywczym. Jednakże, ze względu na brak możliwości określenia dokładnego stężenia substancji biologicznie czynnych w handlowych produktach, niemożliwe było ich wykorzystanie do opracowania skutecznego środka dezynfekującego. Niezbędne było samodzielne pozyskanie ekstraktów z wybranych roślin i ustalenia ich dokładnego stężenia w rozpuszczalniku celem opracowania formułacji środka dezynfekującego o sprecyzowanym składzie.

Zgodnie z metodyką zamieszczoną w rozdziale 5.3., przeprowadzono ekstrakcję bioaktywnych substancji z roślin konopi w dwóch odmianach: *Cannabis S. Santhica* i *Cannabis S. Futura*, z oregano (*Origanum vulgare*), a także gojnika (*Sideritis Scardica*). Konopie i oregano zostały wytypowane na podstawie badań pilotażowych, omówionych powyżej, natomiast gojnik został włączony do badań w oparciu o wyniki prowadzonych równolegle, niepublikowanych badań dotyczących działania przeciwdrobnoustrojowego ekstraktów CO₂. Ze względu na brak handlowych olejków i ekstraktów z tej rośliny niemożliwe było włączenie ich w badania pilotażowe. Warto natomiast podkreślić, że gojnik, należący do rodziny *Lamiaceae*, jest znany ze względu na bogatą zawartość olejków eterycznych. Należy do naturalnych środków wzmacniających system immunologiczny i usprawniających procesy trawienne zachodzące w organizmie. Charakteryzuje się przede wszystkim dużą zawartością węglowodorów monoterpenowych (α -pinen, β -pinen, sabinen i limonen). Ponadto, ekstrakty z gojnika bogate są w związki diterpenowe (Tadic i in., 2012).

Lebiodka pospolita, również należąca do rodziny *Lamiaceae*, powszechnie znana jako oregano, występuje niemal na całym świecie, przy czym kojarzona jest najbardziej z obszarem śródziemnomorskim. Za charakterystyczny zapach oregano oraz jego właściwości biologiczne odpowiadają olejki eteryczne bogate w takie składniki jak: karwakrol i tymol, a także p-cymen, γ-terpinen, kariofilen, spatulenol i germakren-D, przy czym ich procentowa zawartość może się znacząco różnić w zależności od pochodzenia rośliny oraz warunków uprawy (Teixeira i in., 2013).

Konopie siewne *Cannabis sativa*, które również wykorzystano w pracy to szeroko rozpowszechniony gatunek rośliny z rodziny *Cannabaceae*, który można spotkać na wielu obszarach. Pierwsze wzmianki o uprawie tego gatunku w Chinach w celach włókienniczych, a następnie medycznych datowane są na 4000 p.n.e., (Fathordoobady 2019). Nasiona konopi cenione są ze względu na składniki bogate w wartości odżywcze, natomiast aktualnie największą uwagę badaczy przyciąga wysokie stężenie psychoaktywnego alkaloidu Δ-9-tetrahydrokannabinolu, oraz niepsychoaktywnych kannabinoidów takich jak CBD (kannabidiol) i CBG (kannabigerol). Szczególnie ostatnie dwa związki znajdują szerokie zastosowanie w biomedycynie czy kosmetyce ze względu na działanie antybakteryjne i przeciwzapalne (Fathordoobady 2019).

W niniejszej pracy wykorzystano cztery metody ekstrakcji: hydrodestylację, ekstrakcję w nadkrytycznym CO₂, ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami (przy trzech różnych stężeniach rozpuszczalnika – metanolu) oraz ekstrakcję Soxhleta z dwoma różnymi rozpuszczalnikami. Łącznie otrzymano 27 ekstraktów, przebadanych następnie w zakresie zawartości związków polifenolowych oraz aktywności przeciwdrobnoustrojowej i antybiofilmowej. W tabeli 6.11 przedstawiono wykaz ekstraktów uwzględniający sposób ich otrzymania oraz skróty, wykorzystane w opisach kolejnych wyników doświadczeń.

Tabela 6.11. Warianty ekstraktów roślinnych uzyskanych w trakcie eksperymentu oraz skróty wykorzystane w wykresach i opisach w dalszej części pracy doktorskiej

metoda ekstrakcji	Rośliny wykorzystane do ekstrakcji			
	oregano	konopie odm. <i>Santhica</i>	konopie odm. <i>Futura</i>	gojnik
Soxhlet z metanolem	SMO	SMS	SMF	SMG
Soxhlet z heksanem	SHO	SHS	SHF	SHG
łaźnia ultradźwiękowa (z wodą)	UWO	UWS	UWF	UWG
łaźnia ultradźwiękowa (z metanolem i wodą 1:1)	UMWO	UMWS	UMWF	UMWG
łaźnia ultradźwiękowa (z metanolem)	UMO	UMS	UMF	UMG
hydrodestylacja	WO	WS	WF	WG
w nadkrytycznym CO ₂	CO	CS	CF	CG

Źródło: opracowanie własne

6.2.1. Określenie całkowitej zawartości związków polifenolowych w otrzymanych ekstraktach

W pozyskanych ekstraktach oznaczono zawartość związków polifenolowych. Celem analizy było z jednej strony porównanie otrzymanych wyników z wynikami literaturowymi, aby zweryfikować poprawność przeprowadzonego procesu ekstrakcji, a z drugiej sprawdzenie, na ile zawartość związków polifenolowych koreluje z właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi ekstraktów. Wielu autorów podkreśla, że substancje te mogą mieć znaczący udział w aktywności antybakteryjnej czy przeciwgrzybiczej olejków eterycznych i ekstraktów roślinnych (Dżamić i in., 2015).

Wyniki przedstawiające zawartość związków polifenolowych w badanych ekstraktach zamieszczono w tabeli 6.12. Wyniki oznaczeń przedstawiono jako ilość równoważnika kwasu galusowego w 1 g suszu roślinnego użytego do pozyskania ekstraktu (mg GAE/1 g s.m.).

Tabela 6.12. Całkowita zawartość związków polifenolowych w pozyskanych ekstraktach roślinnych

metoda ekstrakcji	Całkowita zawartość związków polifenolowych w ekstraktach z poszczególnych roślin [mg GAE/1 g s.m.]			
	oregano	konopie odm. <i>Santhica</i>	konopie odm. <i>Futura</i>	gojnik
Soxhlet z metanolem	3,82 ^{aA} ± 0,13	3,63 ^{aA} ± 0,15	1,91 ^{bA} ± 0,02	0,13 ^A ± 0,01
Soxhlet z heksanem	3,13 ^{aB} ± 0,16	0,84 ^{bB} ± 0,03	0,91 ^{bB} ± 0,06	0,01 ^{cB} ± 0,00
łażnia ultradźwiękowa wodny	0,01 ^{aC} ± 0,00	0,012 ^{bC} ± 0,00	0,07 ^{cC} ± 0,00	0,01 ^{aB} ± 0,00
łażnia ultradźwiękowa metanolowo-wodny 1:1	0,65 ^{aD} ± 0,03	0,79 ^{aB} ± 0,04	0,4 ^{bD} ± 0,03	0,06 ^{cD} ± 0,01
łażnia ultradźwiękowa metanolowy	1,28 ^{aE} ± 0,06	2,12 ^{bD} ± 0,17	2,68 ^{cE} ± 0,16	0,12 ^{aA} ± 0,00
hydrodestylacja	0,17 ^{aF} ± 0,01	0,16 ^{aE} ± 0,01	0,01 ^{bF} ± 0,00	0,01 ^{cB} ± 0,00
gazem w stanie nadkrytycznym	1,62 ^{aG} ± 0,07	3,16 ^{bF} ± 0,18	n.d.	0,97 ^{cC} ± 0,01

a – c: wartości średnie w wierszach, w ramach określonej metody otrzymywania, oznaczone różnymi literami, różniły się między sobą statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$)

A – G: wartości średnie w kolumnach w obrębie każdej rośliny, oznaczone różnymi literami, różnią się między sobą statystycznie istotnie w ($p \leq 0,05$)

n.d. – nie dotyczy – ekstrakt w wymienionym wariancie nie został pozyskany ze względu na ograniczenia surowcowe

Źródło: opracowanie własne na podstawie badań

Spośród badanych ekstraktów roślinnych, najwyższą zawartością związków polifenolowych charakteryzowały się ekstrakty SMO i SMS (odpowiednio 3,83 i 3,63 mg GAE/1 g s.m.). Zbliżone, choć istotnie niższe, wartości otrzymano dla ekstraktów SHO i CS. Z kolei najniższą zawartość badanych związków odnotowano w ekstraktach pozyskanych z gojnika. Porównując metody ekstrakcji można zauważyć, że najniższe zawartości związków polifenolowych obserwowano w ekstraktach otrzymanych za pomocą ekstrakcji z parą wodną oraz z wykorzystaniem łaźni ultradźwiękowej i wody jako roztworu ekstrakcyjnego. Rodzaj rozpuszczalnika miał duże znaczenie dla efektywności procesu ekstrakcji. Ekstrakcja w łaźni ultradźwiękowej z użyciem roztworu woda-metanol skutkowała istotnie niższym wynikiem zawartości polifenoli w porównaniu z ekstraktami pozyskanymi wyłącznie w metanolu (średnio o 61%). Ekstrakty pozyskane metodą Soxhleeta również różniły się istotnie pod względem zawartości związków polifenolowych w zależności od użytego rozpuszczalnika.

W ekstraktach metanolowych odnotowano wyższą zawartość polifenoli w porównaniu z ekstraktami heksanowymi.

Dane literaturowe zasadniczo potwierdzają uzyskane wyniki, jednakże należy zauważyć, że poszczególne ekstrakty, opisywane w pracach innych badaczy, różnią się często warunkami ekstrakcji, odmianą rośliny czy rozpuszczalnikiem. W przypadków ekstraktów z konopi wyniki uzyskane w niniejszej pracy były zbliżone do wartości otrzymanych przez Worobiej i in. (2015), którzy wykazali zawartość ogólną związków polifenolowych w nasionach konopnych na poziomie 4,07 mg GAE/1g s.m. w ekstraktach z użyciem buforu fosforanowego. W przypadku zawartości polifenoli w ekstraktach z oregano podobne wyniki prezentowali Rodriguez-Solana i in. (2015) uzyskując wynik na poziomie 3,04 oraz 0,13 mg GAE/1g s.m., odpowiednio przy użyciu ekstrakcji Soxhleta i ekstrakcji z użyciem gazu w stanie nadkrytycznym. Natomiast Dambolena i in. (2010) uzyskali wyniki od 8,84 do 18,21 mg GAE/g s.m. metodą ekstrakcji aparatem Derynga, co znacznie przewyższa wyniki uzyskane w niniejszej pracy. Oreopoulou i in., (2020), po zoptymalizowaniu procesu ekstrakcji metodą Soxhleta, uzyskali wynik powyżej 30 mg GAE/1 g s.m. w ekstraktach z oregano. Z kolei Gülcan et al. (2022) w ekstraktach z *Sideritis lanata*, jednego z gatunków gojnika, odnotowali zawartość polifenoli na poziomie 12,25; 20,82 i 61.1mg GAE/g ekstraktu w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika (odpowiednio: 70% etanol, heksan i octan etylu) Należy jednak podkreślić, że zawartość związków polifenolowych nie odzwierciedla w pełni profilu związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym rośliny, na który wpływa obecność innych substancji takich jak np.: alkaloidy, kumaryny, terpeny, aldehydy, karotenoidy, karwakrol czy związki zawierające siarkę (Vaou i in., 2021). Parametr ten został jednak w niniejszej pracy wykorzystany przede wszystkim jako wskaźnik prawidłowego procesu ekstrakcji. Warto zauważyć, że zawartość badanych związków zależna jest od wielu czynników, takich jak: gatunek rośliny, sposób i warunki jej uprawy, zawartość azotu w glebie czy warunki atmosferyczne. Badania wskazują, że czynniki środowiskowe, takie jak poziom CO₂, dostępność wody, temperatura i promieniowanie słoneczne, mogą wpływać na metabolizm wtórny i stymulować produkcję bioaktywnych substancji chemicznych. Wpływ czynników ekogeograficznych jak regionu zbioru na całkowitą zawartość związków polifenolowych opisano m.in. dla *Salvia argentea* i *Salvia officinalis* (Ben Farha, 2013; Santos-Gomes, Fernandes-Ferreira i Organ, 2001). Również działanie wysokiej temperatury w trakcie

ekstrakcji może mieć wpływ na stężenie związków polifenolowych, co znacząco utrudnia porównywalność wyników (Kazimierczak i in., 2011)

Podsumowując, spośród ekstraktów roślinnych badanych w niniejszej pracy najwyższą zawartością związków polifenolowych charakteryzowały się ekstrakty z oregano i konopi odm. *Santhica*. Z kolei porównując metody ekstrakcji można zauważyć, że najwyższe wyniki w zakresie omawianego parametru uzyskano za pomocą ekstrakcji Soxhleta z metanolem, ekstrakcji w metanolu z użyciem łaźni ultradźwiękowej oraz ekstrakcji gazem w stanie nadkrytycznym. Otrzymane wyniki znajdują odzwierciedlenie w światowej literaturze i choć zawartość badanych związków może się znacząco różnić w zależności od czynników niezależnych od badacza, fakt otrzymania takich wyników świadczyć może o prawidłowym, zbliżonym do optymalnego przeprowadzeniu procesu ekstrakcji. Jest to istotny wskaźnik, ponieważ celem pracy nie była optymalizacja procesów chemicznych otrzymywania związków będących przedmiotem pracy, stąd decyzja o zaczerpnięciu metod oraz warunków, jakich używano w literaturze. W dalszej części pracy zaprezentowano wyniki badań właściwości przeciwdrobnoustrojowych oraz antybiofilmowych otrzymanych ekstraktów.

6.2.2. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe otrzymanych ekstraktów roślinnych

Jednym z głównych celów niniejszej pracy doktorskiej było określenie właściwościowości przeciwdrobnoustrojowych otrzymanych ekstraktów roślinnych. Aktywność antybakteryjną otrzymanych substancji przebadano względem tych samych mikroorganizmów, które wykorzystano w badaniach pilotażowych i wyrażono jako minimalne stężenie hamujące wzrost wybranych bakterii. Zakres badanych stężeń wynosił od 0,06 do 16 mg/ml, a jako wartość MIC przyjmowano hamowanie wzrostu mikroorganizmów wskaźnikowych co najmniej w 90%. W przypadku braku zahamowania wzrostu na takim poziomie w najwyższym badanym stężeniu uznawano, że wartość MIC należy przyjąć powyżej 16 mg/ml.

Wartości MIC przedstawiono w trzech tabelach (6.13. – 6.15.), w tym dwie prezentują wyniki uzyskane dla bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, natomiast w trzeciej tabeli znajdują się wartości MIC dla obu grup bakterii oraz dla wszystkich badanych mikroorganizmów. Wyznaczenie jednej wartości dla każdego ekstraktu było niezbędne z uwagi na ich wykorzystanie do opracowania preparatu dezynfekującego. Na podstawie

uzyskanych wyników można stwierdzić, że wszystkie badane ekstrakty wykazywały działanie bakteriostatyczne w stosunku do badanych bakterii, jednak siła ich działania była zmienna i zależna zarówno od mikroorganizmu wskaźnikowego, jak i metody ekstrakcji oraz gatunku rośliny wykorzystanej do pozyskania wybranego ekstraktu.

W grupie bakterii Gram dodatnich (tabela 6.13.) wartości MIC kształtowały się w pełnym badanym zakresie stężeń, od 0,06 do 16 mg/ml, przy czym nie dla wszystkich związków ustalono minimalne stężenie hamujące. Najsilniejsze właściwości antybakteryjne odnotowano dla ekstraktów otrzymanych z obu odmian konopi na drodze ekstrakcji w nadkrytycznym CO₂, ekstrakcji Soxhleeta i ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami z metanolem i mieszaniną metanol:woda (1:1). Najniższą wartość MIC, na poziomie 0,06 do 0,125 mg/ml, ustalono dla ekstraktów CO₂. Nieco wyższe wyniki, w granicach 0,25 do 1 mg/ml, w zależności od badanego mikroorganizmu i użytego rozpuszczalnika, odnotowano dla ekstraktów z konopi pozyskanych metodą ekstrakcji Soxhleeta oraz wspomaganej ultradźwiękami z użyciem metanolu i mieszaniny metanol:woda (1:1). Ekstrakty pozyskane na drodze hydrodestylacji oraz ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami z użyciem wody charakteryzowały się słabszą aktywnością antybakteryjną. Minimalne stężenie hamujące ustalono dla tych ekstraktów na poziomie 1 – 4 mg/ml (WF i WS) oraz 4 – 8 mg/ml (UWF i UWS). Spośród ekstraktów z oregano najsilniejsze działanie wykazywały ekstrakty pozyskane w nadkrytycznym CO₂ oraz metodą Soxhleeta, dla których minimalne stężenie hamujące, w zależności od mikroorganizmu i użytego rozpuszczalnika, kształtowało się na poziomie 0,5 – 2 mg/ml (CO) oraz 1 – 2 mg/ml (SMO) i 1 – 4 mg/ml (SHO). Najwyższe wartości MIC, wskazujące na naj słabsze oddziaływanie, obserwowano w przypadku ekstraktów z gojnika. Wyjątek stanowił ekstrakt metanolowy otrzymany na drodze ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami, gdzie wartości MIC kształtowały się na poziomie od 0,5 do 1 mg/ml. Naj słabsze rezultaty obserwowano dla ekstraktów z oregano i gojnika pozyskanych na drodze hydrodestylacji oraz ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami (z wodą), które nie hamowały wzrostu żadnej z bakterii Gram-dodatnich na poziomie $\geq 90\%$ w badanym zakresie stężeń (MIC >16 mg/ml). Analizując dane w tabeli 6.13 można również zauważyć zróżnicowaną wrażliwość badanych bakterii Gram-dodatnich na poszczególne ekstrakty. Największą wrażliwość wykazywały bakterie z gatunku *M. luteus*, z kolei najmniejszą wrażliwością charakteryzowały się zwykle bakterie z gatunków *B. subtilis*, *C. perfringens* oraz *E. faecalis*.

Tabela 6.13. Minimalne stężenia hamujące (MIC) badanych ekstraktów roślinnych wyznaczone wobec wybranych bakterii Gram-dodatnich

Pochodzenie ekstraktu/olejku	Wariant rozpuszczalnika użyty w ekstrakcji	Symbol	Wartość MIC w mg/ml					
			<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>M. luteus</i>
hydrodestylacja								
oregano		WO	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16
konopie <i>Santhica</i>		WS	4	1	2	1	1	1
konopie <i>Futura</i>		WF	4	2	4	1	2	1
gojnik		WG	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16	16
ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami								
oregano	wodny	UWO	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16
	metanolowo- wodny (1:1)	UMWO	> 16	> 16	> 16	8	8	8
	metanolowy	UMO	8	> 16	8	4	8	1
konopie <i>Santhica</i>	wodny	UWS	4	4	4	4	8	4
	metanolowo- wodny (1:1)	UMWS	1	0,5	0,25	2	0,25	0,25
	metanolowy	UMS	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
konopie <i>Futura</i>	wodny	UWF	8	4	8	4	8	4
	metanolowo- wodny (1:1)	UMWF	1	1	0,25	0,5	0,25	0,25
	metanolowy	UMF	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25
gojnik	wodny	UWG	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16	>16
	metanolowo- wodny (1:1)	UMWG	4	> 16	> 16	8	8	4
	metanolowy	UMG	1	0,5	1	1	1	1
ekstrakcja metodą Soxhleta								
oregano	metanolowy	SMO	2	1	2	1	2	1
	heksanowy	SHO	2	1	4	1	4	1
konopie <i>Santhica</i>	metanolowy	SMS	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125
	heksanowy	SHS	0,25	0,25	0,5	0,25	0,5	0,125
konopie <i>Futura</i>	metanolowy	SMF	0,5	0,25	1	0,25	1	0,125
	heksanowy	SHF	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5	0,25
gojnik	metanolowy	SMG	8	4	8	8	8	4
	heksanowy	SHG	4	1	4	2	4	4
ekstrakcja w nadkrytycznym CO ₂								
oregano		CO	2	1	1	1	1	0,5
konopie <i>Santhica</i>		CS	0,125	0,06	0,125	0,06	0,125	0,06
gojnik		CG	4	4	2	2	8	4

Źródło: opracowanie własne na podstawie badań

Oddziaływanie antagonistyczne otrzymanych ekstraktów wobec bakterii Gram-ujemnych, w tym *E. coli*, *C. jejuni*, *S. enterica* i *C. perfringens* zestawiono w tabeli 6.14.. Zakres otrzymanych wartości MIC kształtował się na poziomie od 0,125 do ponad 16 mg/ml zarówno w zależności od mikroorganizmu wskaźnikowego jak i metody ekstrakcji. Najniższe stężenie hamujące ustalono dla ekstraktu CO₂ z konopi odm. *Santhica*, które wobec *S. Enteritidis* wynosiło 0,125 mg/ml, a w stosunku do pozostałych bakterii Gram-ujemnych 0,25 mg/ml. Niskie wartości MIC odnotowano również dla ekstraktów z obu odmian konopi pozyskanych na drodze ekstrakcji Soxhleta, które kształtowały się w zakresie od 0,5 do 2 mg/ml oraz od 1 do 4 mg/ml odpowiednio dla ekstraktów z konopi odm. *Santhica* i odm. *Futura*. Ekstrakty metanolowe i metanolowo-wodne otrzymane metodą ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami charakteryzowały się nieco wyższymi wartościami MIC, które w zależności od mikroorganizmu wynosiły od 1 do 8 mg/ml. Z kolei ekstrakty wodne wykazały słabszą aktywność antybakteryjną względem bakterii Gram-ujemnych, a wartości MIC kształtowały się na poziomie od 8 do >16 mg/ml.

Ekstrakty pozyskane z gojnika i oregano charakteryzowały się znacznie słabszym działaniem przeciwdrobnoustrojowym niż te pozyskane z konopi. Spośród ekstraktów z oregano, najsilniejszymi właściwościami bakteriostatycznymi wobec bakterii Gram-ujemnych charakteryzował się ekstrakt CO₂, w przypadku którego wartość MIC kształtowała się na poziomie od 1 do 2 mg/ml. Przy wykorzystaniu tej samej metody ekstrakcji, tj.: z gazem w stanie nadkrytycznym, dla gojnika ustalono wartość MIC na poziomie od 1 do 8 mg/ml. Ekstrakty otrzymane na drodze hydrodestylacji oraz wodne i metanolowo-wodne ekstrakty pozyskane metodą ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami nie były skuteczne wobec żadnej z badanych bakterii Gram-ujemnych w badanym zakresie stężeń (MIC > 16 mg/ml). Spośród ekstraktów metanolowych z tej grupy jedynie ekstrakt z gojnika wykazywał silne działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec *S. Enteritidis* oraz *P. aeruginosa* (MIC odpowiednio 1 i 2 mg/ml).

Tabela 6.14. Minimalne stężenia hamujące (MIC) badanych ekstraktów roślinnych wyznaczone wobec wybranych bakterii Gram-ujemnych

Pochodzenie ekstraktu/olejku	Wariant rozpuszczalnika użyty w ekstrakcji	Symbol	Wartość MIC w mg/ml			
			<i>E.coli</i>	<i>C.jejuni</i>	<i>S. enterica ser. Enteritidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
hydrodestylacja						
oregano		WO	> 16	> 16	> 16	> 16
konopie <i>Santhica</i>		WS	8	2	2	4
konopie <i>Futura</i>		WF	8	2	4	4
gojnik		WG	> 16	> 16	> 16	> 16
ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami						
oregano	wodny	UWO	> 16	> 16	> 16	>16
	metanolowo- wodny (1:1)	UMWO	> 16	> 16	> 16	8
	metanolowy	UMO	> 16	16	8	8
konopie <i>Santhica</i>	wodny	UWS	> 16	8	4	16
	metanolowo- wodny (1:1)	UMWS	4	2	1	8
	metanolowy	UMS	1	1	4	2
konopie <i>Futura</i>	wodny	UWF	> 16	8	8	16
	metanolowo- wodny (1:1)	UMWF	4	2	2	4
	metanolowy	UMF	2	1	2	4
gojnik	wodny	UWG	> 16	> 16	> 16	> 16
	metanolowo- wodny (1:1)	UMWG	> 16	> 16	> 16	> 16
	metanolowy	UMG	> 16	16	1	2
ekstrakcja metodą Soxhleta						
oregano	metanolowy	SMO	8	4	2	8
	heksanowy	SHO	4	4	4	2
konopie <i>Santhica</i>	metanolowy	SMS	1	1	1	2
	heksanowy	SHS	2	0,5	0,5	2
konopie <i>Futura</i>	metanolowy	SMF	2	1	1	2
	heksanowy	SHF	2	1	1	4
gojnik	metanolowy	SMG	> 16	8	8	> 16
	heksanowy	SHG	8	4	4	16
ekstrakcja w nadkrytycznym CO ₂						
oregano		CO	2	1	1	2
konopie <i>Santhica</i>		CS	0,25	0,25	0,125	0,25
gojnik		CG	8	4	2	8

Źródło: opracowanie własne na podstawie badań

Analizując powyższe tabele można zauważyć, że wartości MIC wyznaczone dla badanych ekstraktów różniły się znacząco zarówno w zależności od rodzaju ekstraktu (w tym rodzaju rośliny i metody ekstrakcji) jak i gatunku mikroorganizmu wskaźnikowego. Aby zrealizować założenia postawione w niniejszej pracy, konieczne było wyznaczenie dla każdego ekstraktu wspólnych wartości MIC celem opracowania preparatu dezynfekującego skutecznego w hamowaniu rozwoju wszystkich mikroorganizmów wskaźnikowych (Tabela 6.15.).

Tabela 6.15. Wspólne wartości MIC badanych ekstraktów roślinnych wobec mikroorganizmów wskaźnikowych

Pochodzenie ekstraktu/ olejku	Wariant rozpuszczalnika użyty w ekstrakcji	Symbol	Wartość MIC w mg/ml dla		
			Gram- dodatnich	Gram- ujemnych	wszystkich bakterii
hydrodestylacja					
oregano		WO	> 16	> 16	> 16
konopie <i>Santhica</i>		WS	4	8	8
konopie <i>Futura</i>		WF	4	8	8
gojnik		WG	> 16	> 16	> 16
ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami					
oregano	wodny	UWO	> 16	> 16	> 16
	metanolowo- wodny (1:1)	UMWO	> 16	> 16	> 16
	metanolowy	UMO	8	> 16	> 16
konopie <i>Santhica</i>	wodny	UWS	8	> 16	> 16
	metanolowo- wodny (1:1)	UMWS	2	8	8
	metanolowy	UMS	0,5	4	4
konopie <i>Futura</i>	wodny	UWF	8	> 16	> 16
	metanolowo- wodny (1:1)	UMWF	1	4	4
	metanolowy	UMF	0,5	4	4
gojnik	wodny	UWG	> 16	> 16	> 16
	metanolowo- wodny (1:1)	UMWG	> 16	> 16	> 16
	metanolowy	UMG	1	> 16	> 16
ekstrakcja metodą Soxhleta					
oregano	metanolowy	SMO	2	8	8
	heksanowy	SHO	4	4	4
konopie <i>Santhica</i>	metanolowy	SMS	0,5	2	2
	heksanowy	SHS	0,5	2	2
konopie <i>Futura</i>	metanolowy	SMF	0,5	2	2
	heksanowy	SHF	0,5	4	4
gojnik	metanolowy	SMG	8	> 16	> 16
	heksanowy	SHG	4	16	16
ekstrakcja w nadkrytycznym CO ₂					
oregano		CO	2	2	2
konopie <i>Santhica</i>		CS	0,13	0,25	0,25
gojnik		CG	8	8	8

Źródło: opracowanie własne na podstawie badań

Jak wynika z danych w tabeli 6.15., najsilniejszym działaniem przeciwdrobnoustrojowym charakteryzował się ekstrakt CO₂ z konopi *Santhica*, dla którego wartość MIC wyznaczona dla wszystkich badanych mikroorganizmów kształtowała się na poziomie 0,25 mg/ml. Czterokrotnie wyższe wartości MIC, na poziomie 2 mg/ml uzyskano dla ekstraktów: CO₂ z oregano (CO), metanolowych Soxhleta z obu odmian konopi (SMS i SMF) i heksanowego Soxhleta z konopi odm. *Santhica* (SHS). Minimalne stężenie hamujące na poziomie 4 mg/ml wyznaczono dla ekstraktów heksanowych Soxhleta z konopi odm. *Futura* i oregano (SHF, SHO), ekstraktów metanolowych otrzymanych na drodze ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami z obu odmian konopi (UMS i UMF) oraz metanolowo-wodnych z konopi odm. *Futura* (UMWF). Dla ekstraktów CO₂ z gojnika (CG), metanolowego Soxhleta z oregano (SMO), metanolowo-wodnego pozyskanego na drodze ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami z konopi odm. *Santhica* (UMWS) oraz dwóch ekstraktów konopnych pozyskanych metodą hydrodestylacji (WS i WF) wartość MIC ustalono na poziomie 8 mg/ml. Dla pozostałych ekstraktów minimalne stężenie hamujące wszystkie badane mikroorganizmy wskaźnikowe przekraczało 16 mg/ml. Porównując uzyskane wyniki z danymi literaturowymi można zauważyć, że wartości MIC podawane przez różnych autorów niejednokrotnie różnią się od siebie, jak również odbiegają od uzyskanych w niniejszej pracy. Przykładowo, Jokić i in., (2022) pozyskując ekstrakty konopne metodą nadkrytycznego CO₂ uzyskali kilkukrotnie niższe wartości MIC – od 0,01 do 0,04 mg/ml dla *B. subtilis*; od 0,01 do 0,06 mg/ml dla *S. aureus*; od 0,01 do 0,35 mg/ml dla *E. coli* oraz od 0,013 do 0,07 dla *P. aeruginosa*, w zależności od warunków ekstrakcji. Optymalne parametry procesu pozwoliły na pozyskanie najwyższej zawartości związków aktywnych takich jak: CBD, α -pinen, β -pinen, i limonen w ekstraktach, co dało bezpośrednie przełożenie na ich wyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową. Natomiast Kumar i in., (2011) uzyskali znacznie wyższe wartości MIC dla ekstraktów pozyskanych metodą Soxhleta z metanolem w stosunku do bakterii *E. coli*, *S. aureus* oraz *P. aeruginosa* ustalając wartości MIC odpowiednio na poziomie 25, 50 i 50 mg/ml. Różnice w uzyskanych wynikach mogą mieć związek z warunkami ekstrakcji (czas i temperatura procesu), jakością surowca roślinnego, a także przechowywaniem próbek (w przypadku przytoczonych badań ekstrakty autoklawowano w 121°C w celu osiągnięcia sterylności, co mogło mieć wpływ na rozpad niektórych substancji biologicznie czynnych). W niniejszej pracy obserwowano wpływ nie tylko metody ekstrakcji, ale też rodzaju rozpuszczalnika na aktywność biologiczną. Przykładowo, w przypadku ekstraktów

otrzymanych metodą ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami niższe wartości MIC odnotowano dla ekstraktów metanolowych i metanolowo-wodnych niż wodnych, przy czym najniższe wartości otrzymano po zastosowaniu wyłącznie metanolu.

Wartości przedstawione w tabeli 6.15. pozwalają stwierdzić, że bakterie z grupy Gram-ujemnych były mniej wrażliwe na działanie pozyskanych ekstraktów niż bakterie Gram-dodatnie. Jest to prawdopodobnie związane z budową ściany komórkowej w obrębie dwóch grup bakterii. Bakterie Gram-dodatnie mają grubą (20–80 nm) ścianę komórkową stanowiącą zewnętrzną powłokę komórki, jednakże nie posiadają żadnych dodatkowych struktur osłonowych. W odróżnieniu od nich, bakterie Gram-ujemne mają stosunkowo cienką (<10 nm) warstwę ściany komórkowej, jednakże dysponują dodatkową zewnętrzną warstwą membranową, w której znajdują się fosfolipidy, białka i lipolisacharydy. Te różnice w budowie komórki sprawiają, że bakterie Gram-ujemne są zwykle mniej wrażliwe, w szczególności na działanie stresu zewnętrznego, w tym np.: wysoką temperaturę, promieniowanie UV i antybiotyki (Mai-Prochnow i in., 2009). W niniejszej pracy wartości MIC wyznaczone dla bakterii Gram-ujemnych były zazwyczaj od dwóch do szesnastu razy wyższe niż te uzyskane dla bakterii Gram-dodatnich, z wyjątkiem sytuacji, w których nie udało się wyznaczyć MIC w badanym zakresie stężeń. Dane literaturowe potwierdzają obserwowane tendencje zarówno biorąc pod uwagę grupę mikroorganizmów jak i rodzaj ekstrakcji. Tadic i in., (2012), badając ekstrakty z gojnika pozyskane przy pomocy ekstrakcji w nadkrytycznym CO₂ oraz ekstrakcji Soxhletha z etanolem, uzyskali kilkakrotnie wyższe wartości MIC względem bakterii Gram-ujemnych (*E. coli* i *P. aeruginosa*) w porównaniu z wartościami MIC ustalonymi dla bakterii Gram-dodatnich (*S. pyogenes*, *S. aureus* i *E. faecalis*). Autorzy zaobserwowali również lepsze rezultaty dla ekstraktów z gojnika pozyskanych metodą Soxhletha z etanolem, dla których wartości MIC wahały się w zakresie 1,28 – 2,56 mg/ml w zależności od mikroorganizmu wskaźnikowego, w porównaniu do ekstraktów CO₂, gdzie wartość MIC ustalono na poziomie równym lub przekraczającym 2,56 mg/ml. Podobnie, Zitek i in., (2021) uzyskali niższe wartości MIC dla ekstraktów CO₂ z oregano względem *S. aureus* (0,14 – 0,33 mg/ml), natomiast zbliżone względem *E. coli*, które wahały się od 0,7 do 2,5 mg/ml w zależności od warunków ekstrakcji. Natomiast Kosakowska i in., (2021) dla ekstraktów z oregano pozyskanych metodą Soxhletha z etanolem ustalili wartości MIC w zakresie 4-32 mg/ml (dla *S. aureus*) i 4 - 64 mg/ml (dla *E. coli*) w zależności od czasu ekstrakcji oraz znacząco wyższe wartości, w przypadku klasycznej ekstrakcji z wytrząsaniem z etanolem,

gdzie MIC ustalono na poziomie 6,9; 6,9; 13,9 i ponad 100 mg/ml kolejno dla *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. Typhimurium* i *P. Putida*.

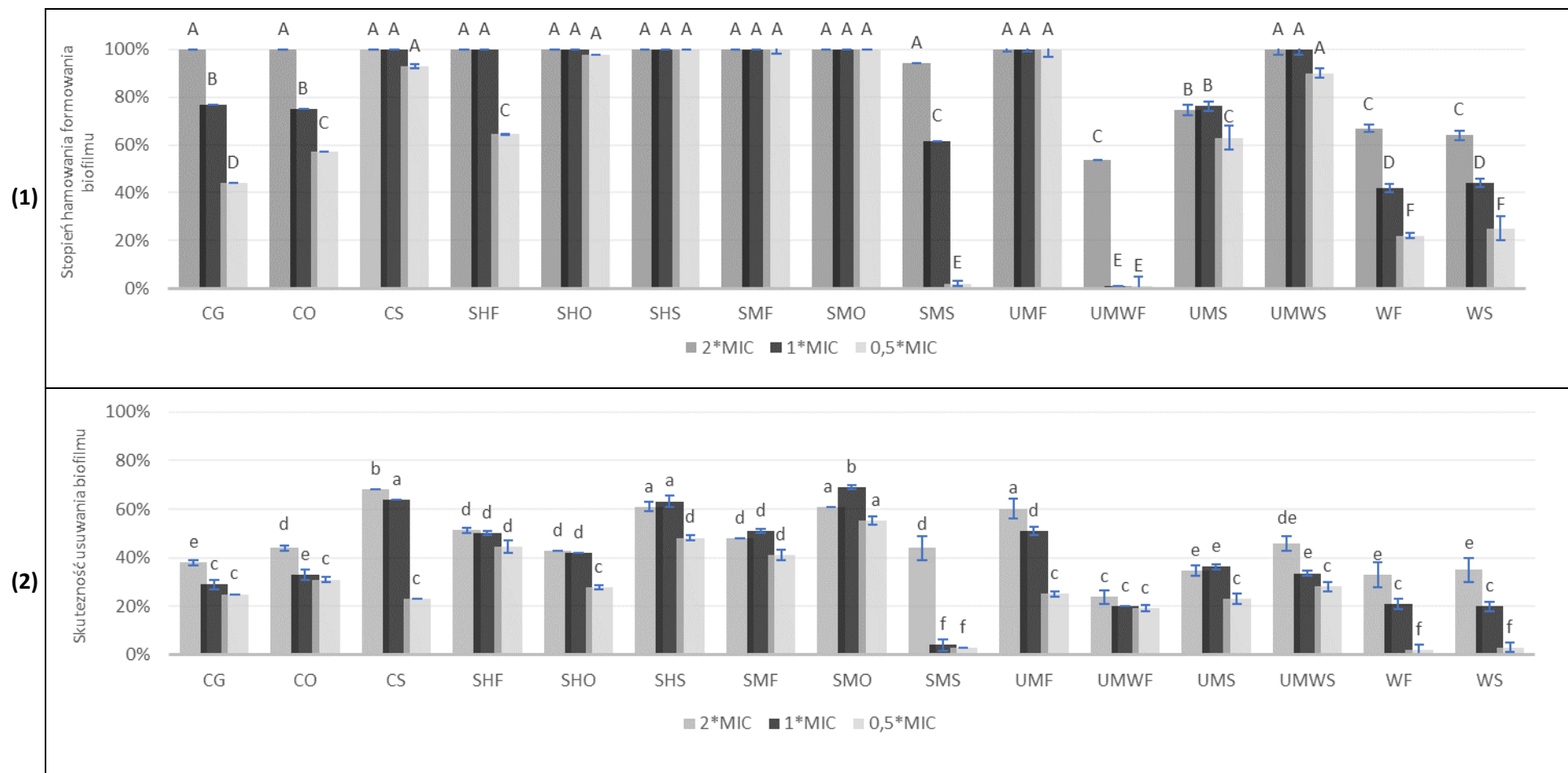
Podsumowując, wybrane na podstawie powyższych badań piętnaście ekstraktów, dla których wartości MIC wyznaczono na poziomie 0,25 do 8 mg/ml, przebadano w kolejnym etapie pracy w zakresie właściwości antybiofilmowych. Wśród wybranych ekstraktów znajdowały się 3 ekstrakty pozyskane metodą ekstrakcji nadkrytycznej (CS, CG, CO), 4 pozyskane metodą ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami, w tym 2 metanolowe (UMF, UMS) i 2 metanolowo-wodne (UMWF i UMWS), 2 otrzymane na drodze hydrodestylacji (WF i WS) oraz 6 pozyskanych w wyniku ekstrakcji Soxhleta z oregano i z konopi.

6.2.3. Właściwości antybiofilmowe otrzymanych ekstraktów roślinnych

Wyznaczenie minimalnego stężenia hamującego dla poszczególnych ekstraktów stanowiło punkt wyjścia do kolejnych badań w celu wykorzystania ekstraktów do stworzenia formułacji środka przeciwdrobnoustrojowego. Należy jednak podkreślić, że sposób wyznaczania wartości MIC nie odzwierciedla rzeczywistej natury bytowania bakterii w środowisku produkcyjnym, ponieważ zwykle przebywają one w wielogatunkowych skupiskach, tworząc biofilm. Z tego względu niezbędne było ustalenie stężenia ekstraktów, przy którym nie tylko wzrost wszystkich badanych mikroorganizmów wskaźnikowych zostanie zredukowany o minimum 90%, ale też skutecznie zahamowane będzie formowanie biofilmu. W celu wyznaczenia takich stężeń przeprowadzono eksperyment polegający na symulacji tworzenia biofilmu bakteryjnego. Ekstrakty roślinne zostały przetestowane w dwóch kierunkach: jako czynnik hamujący tworzenie biofilmu oraz jako czynnik usuwający już istniejący biofilm. Jak wspomniano wyżej, do badania wytypowano 15 ekstraktów, dla których na poprzednim etapie ustalono MIC poniżej 16 mg/ml. Działanie antybiofilmowe przetestowano w trzech wariantach stężeń: 2*MIC, 1*MIC i 0,5*MIC, wobec trzech bakterii wskaźnikowych: dwóch z grupy bakterii Gram-dodatnich (*S. aureus* i *L. monocytogenes*) oraz jednej z grupy bakterii Gram-ujemnych (*P. aeruginosa*). Bakterie wybrane do eksperymentu są typowymi przedstawicielami grup Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, znanych ze zdolności do wytwarzania biofilmu w środowisku produkcyjnym przemysłu spożywczego (Carrascosa i in., 2021). Wyniki działania antybiofilmowego wyrażone jako procent zahamowania tworzenia się biofilmu (1) lub procent skuteczności usunięcia dojrzałego biofilmu (2) przedstawiono na wykresach 6.1 – 6.3 i na fotografiach 6.1 – 6.3.

Na podstawie wyników zamieszczonych na wykresie 6.1.(1). można stwierdzić, że w stężeniu 2*MIC każdy z badanych ekstraktów wykazywał działanie hamujące powstawanie biofilmu formowanego przez *L. monocytogenes* w zakresie od 54% do 100%. W stężeniu 1*MIC wartości te były niższe o kilkanaście punktów procentowych i wahały się od 42% do 100%, z wyjątkiem ekstraktu UMWF, który w stężeniu 1*MIC nie hamował formowania biofilmu przez *L. monocytogenes*. W najniższym badanym stężeniu, 0,5*MIC, zakres hamowania biofilmu wynosił od 22% do 100%, przy czym ekstrakty UMWF i SMS nie wykazywały żadnej aktywności hamującej. Porównując wartości 1*MIC oraz 0,5*MIC, można zauważyć, że dla siedmiu z ekstraktów uzyskano nieróżniące się istotnie wyniki hamowania procesu tworzenia biofilmu na poziomie 90% - 100% (ekstrakty: CS, UMF, UMWS, SHO, SMO, SMF i SHS), co wskazuje na ich największy potencjał antybiofilmowy. W stężeniu 1*MIC, zahamowanie formowania biofilmu w zakresie 94% - 100% uzyskano także dla ekstraktów: SMS, SHF, CG i CO, natomiast stopień zahamowania tworzenia biofilmu w stężeniu 0,5*MIC przez te ekstrakty był od 25 do 35 punktów procentowych niższy. Najniższy stopień zahamowania formowania biofilmu obserwowano po zastosowaniu ekstraktów WF, WS i UMWF, niezależnie od stężenia. Dla ekstraktów z konopi i oregano pozyskanych metodą Soxhleta z heksanem nie odnotowano istotnych różnic w działaniu hamującym powstawanie biofilmu. Spośród ekstraktów CO₂ najsilniejsze działanie wykazywał ekstrakt z konopi.

Na wykresie 6.1.(2) zestawiono natomiast wyniki dotyczące skuteczności badanych ekstraktów w usuwaniu dojrzałego biofilmu bakterii *L. monocytogenes*. W najwyższym badanym stężeniu 2*MIC, wszystkie ekstrakty wykazywały zdolność usuwania biofilmu, w zakresie od 24% do 69%. Stopień usuwania biofilmu przez ekstrakty w stężeniu 1*MIC był bardzo zbliżony i wynosił od 20 do 68%, przy czym ekstrakt SMS nie wykazywał zdolności usunięcia dojrzałego biofilmu w żadnym stopniu. Najsilniejsze zdolności redukcji biofilmu, przy zastosowaniu stężenia 1*MIC, wykazywały ekstrakty: SMO, CS i SHS (odpowiednio: 69%, 64% i 63%), natomiast najsłabsze działanie odnotowano dla ekstraktów: WF, UMWF, WS i SMS ($\leq 20\%$).

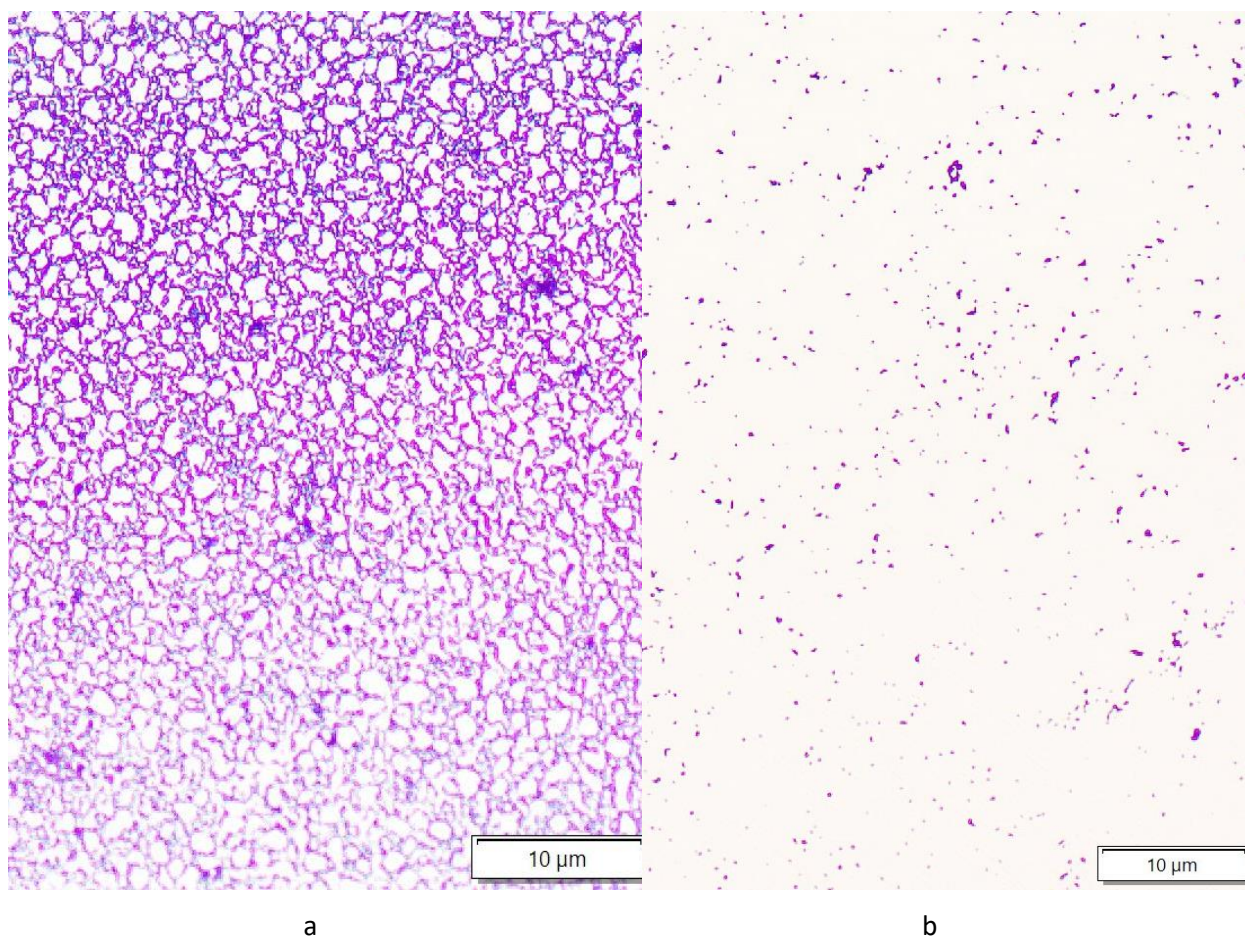


Wykres 6.1. Wpływ badanych ekstraktów roślinnych na formowanie biofilmu (1) oraz usuwanie dojrzałego biofilmu (2) wytworzonego przez bakterie *L. monocytogenes*

Średnie oznaczone różnymi literami (A-F) dla formowania biofilmu oraz oznaczone literami (a-f) dla usuwania dojrzałego biofilmu, różniły się między sobą istotnie ($p \leq 0,05$)

Źródło: opracowanie własne na podstawie badań

Choć wyniki wskazują na niepełne usunięcie dojrzałego biofilmu wytworzonego przez *L. monocytogenes*, to usunięcie powyżej 60% można uznać za znaczne i skuteczne w kontekście prowadzonego eksperymentu. Poniżej zamieszczono zdjęcie mikroskopowe (Fotografia 6.1.) ukazujące różnicę w strukturze biofilmu utworzonego przez *L. monocytogenes* przed (a) i po (b) poddaniu działaniu jednego z najsilniejszych ekstraktów (CS). Porównując oba zdjęcia można zauważyć, że zastosowanie ekstraktu CO₂ z konopi wyraźnie narusza strukturę biofilmu bakteryjnego, pozostawiając jedynie pojedyncze jego fragmenty przyłączone do podłoża.



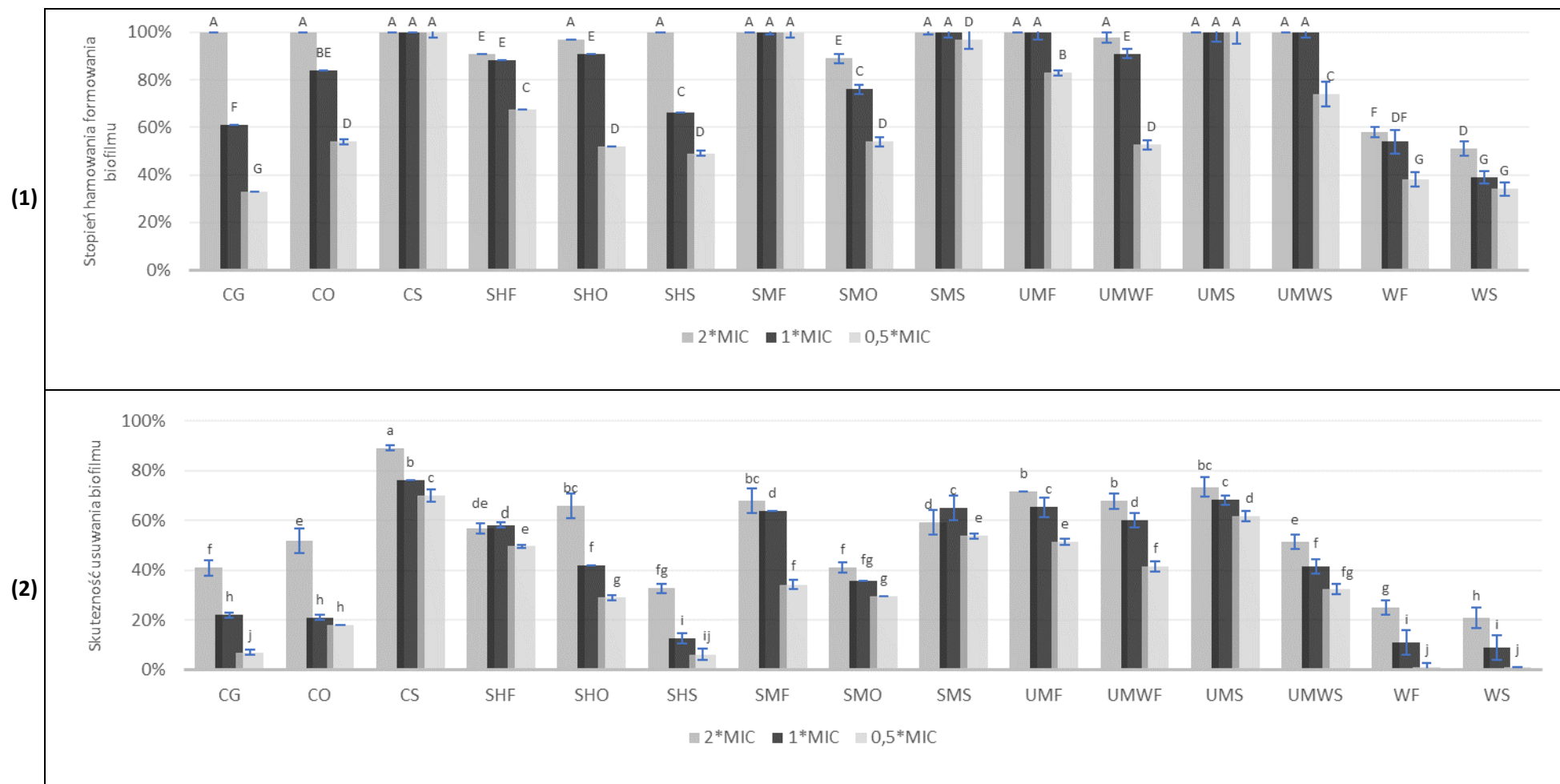
Fotografia 6.1. Obraz mikroskopowy dojrzałego biofilmu bakterii *L. monocytogenes* przed (a) oraz po (b) zastosowaniu ekstraktu z konopi otrzymanego metodą ekstrakcji nadkrytycznym CO₂ (CS, stężenie 1*MIC = 0,25 mg/ml, redukcja 64%)

Źródło: opracowanie własne

Na wykresie 6.2. przedstawiono wyniki antybiofilmowego oddziaływania wybranych ekstraktów względem bakterii *S. aureus*. Jak można zauważyć uzyskano wyższe wartości procentowego hamowania formowania i usuwania biofilmu w stosunku do rezultatów otrzymanych wobec *L. monocytogenes*. Każdy z badanych ekstraktów hamował formowanie

biofilmu przez *S. aureus* w zakresie od 33% do 100%, w zależności od ekstraktu i stężenia (wykres 6.2.(1)). W stężeniu 2*MIC niemal każdy z badanych ekstraktów hamował formowanie biofilmu na poziomie powyżej 90%. Jedynymi wyjątkami były ekstrakty konopne pozyskane metodą hydrodestylacji, dla których hamowanie tworzenia biofilmu przez *S. aureus* nie przekroczyło 60%. Cztery najskuteczniejsze ekstrakty (CS, UMS, SMF i SMS) całkowicie hamowały formowanie biofilmu tworzonego przez *S. aureus* w każdym z badanych stężeń. Ponadto, w stężeniu 1*MIC, równie skuteczne były ekstrakty: UMF i UMWS. Spośród ekstraktów CO₂ zdecydowanie najsilniej działał ten pozyskany z konopi, czego efektem były wyższe wartości zahamowania biofilmu od ekstraktów pozyskanych z oregano i gojnika o odpowiednio: 16 i 39 punktów procentowych (przy stężeniu 1*MIC). Podobną tendencję obserwowano po zastosowaniu ekstraktów pozyskanych metodą Soxhleta, wśród których ekstrakty z konopi ograniczały formowanie biofilmu przez *S. aureus* od 9 do 24 %. skuteczniej od pozyskanych z oregano.

Wszystkie badane ekstrakty wykazywały również działanie w zakresie usuwania dojrzałego biofilmu utworzonego przez *S. aureus* w stężeniach 2*MIC i 1*MIC (wykres 6.2.(2)). Zakres redukcji dojrzałego biofilmu w najwyższym stężeniu (2*MIC) wynosił od 21% do 89%, a w stężeniu 1*MIC od 9% do 76%. Najsilniejszy efekt redukcji dojrzałego biofilmu, w stężeniu 1*MIC, uzyskano przy zastosowaniu ekstraktu CO₂ z konopi. Silny efekt, chociaż istotnie niższy, na poziomie od 60% do 68%, uzyskano także przy zastosowaniu ekstraktów: UMS, UMF, SMS, SMF, UMWF. Najniższą efektywność usuwania biofilmu odnotowano dla ekstraktów SHS, WF i WS (odpowiednio: 13%, 11% i 9%). Pod względem pochodzenia ekstraktów, największą aktywnością w usuwaniu biofilmu wytworzonego przez bakterie *S. aureus* charakteryzowały się ekstrakty z konopi, dla których uzyskane wartości były istotnie wyższe niż uzyskane dla ekstraktów z oregano czy gojnika przy zastosowaniu tego samego stężenia (w każdym z badanych stężeń) i jednakowej metody ekstrakcji.

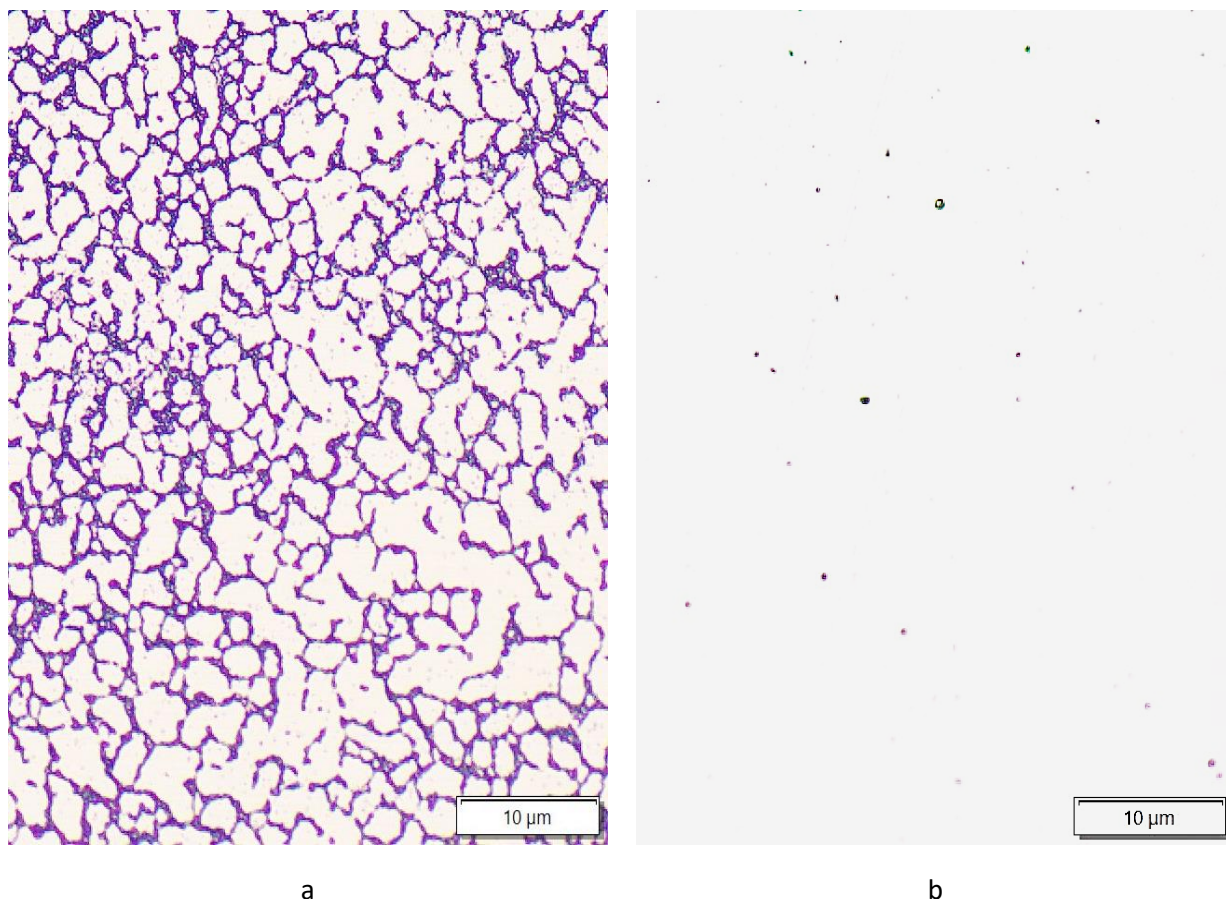


Wykres 6.2. Wpływ badanych ekstraktów roślinnych na formowanie biofilmu (1) oraz usuwanie dojrzałego biofilmu (2) wytworzonego przez bakterie *S. aureus*

Wartości średnie procentowe, oznaczone różnymi literami (A-G) dla formowania biofilmu oraz oznaczone literami (a-j) dla usuwania dojrzałego biofilmu, różniły się między sobą istotnie ($p \leq 0,05$)

Źródło: opracowanie własne na podstawie badań

Porównując otrzymane wyniki redukcji dojrzałego biofilmu, warto zwrócić uwagę na obraz mikroskopowy struktur utworzonych przez *S. aureus* pod wpływem działania zastosowanych ekstraktów (Fotografia 6.2.). Wyraźnie widać różnicę w skuteczności rozbicia zwartej formacji biofilmu jak i w efektywności usunięcia komórek bakteryjnych z podłoża. W wyniku działania ekstraktu CS w stężeniu 1*MIC, biofilm został zredukowany do pojedynczych komórek bakteryjnych w małej liczbie.



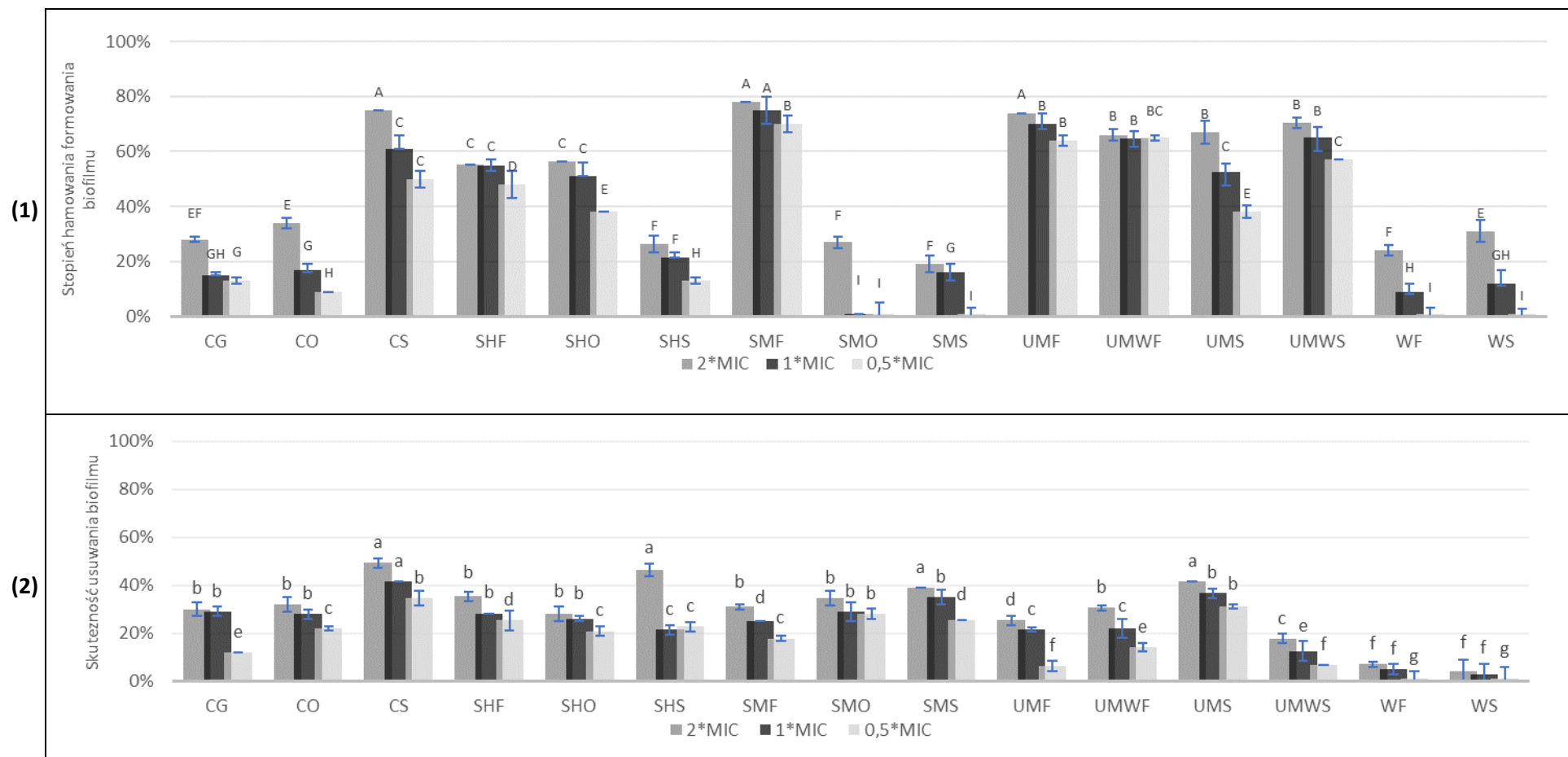
Fotografia 6.2. Obraz mikroskopowy dojrzałego biofilmu bakterii *S. aureus* przed (a) oraz po (b) zastosowaniu ekstraktu z konopi otrzymanego metodą ekstrakcji nadkrytycznym CO₂ (CS, stężenie 1*MIC = 0,25 mg/ml, redukcja 76%)

Źródło: opracowanie własne

Analizując wyniki dla *P. aeruginosa* można zauważyć, że biofilm wytworzony przez ten mikroorganizm cechował się najmniejszą wrażliwością na działanie badanych substancji roślinnych. Żaden z ekstraktów nie zahamował formowania biofilmu ze skutecznością 100%, nawet przy zastosowaniu stężenia 2*MIC (Wykres 6.3.(1)). Największą efektywność w hamowaniu formowania biofilmu, zaobserwowano przy stężeniu 2*MIC dla ekstraktów z konopi, w tym SMF – na poziomie 78%, UMF – 74% i CS – 75%. Ekstrakt SMF hamował

powstawanie biofilmu na poziomie 75% również w stężeniu 1*MIC. Zbliżone, choć istotnie różniące się wartości zahamowania formowania biofilmu *P. aeruginosa* odnotowano przy stężeniu 2*MIC lub 1*MIC dla ekstraktów UMWS, UMWF, oraz UMS. Ekstrakty CO₂ z gojnika (CG) i oregano (CO), a także z konopi pozyskane metodą Soxhleta i hydrodestylacji (SHS, SMS, WS i WF) hamowały formowanie biofilmu znacząco słabiej, tj.: w zakresie 19% - 34% (2*MIC) oraz 9% - 21% (1*MIC), przy czym ekstrakt SMO w stężeniu 1*MIC nie wykazał żadnej aktywności w hamowaniu formowania biofilmu *P. aeruginosa*.

Skuteczność usuwania dojrzałego biofilmu utworzonego przez *P. aeruginosa* ustalono w zakresie od 4% do 49%, przy zastosowaniu stężenia 2*MIC, zatem znacznie mniej niż w przypadku dwóch bakterii Gram-dodatnich. Przy zastosowaniu stężenia 1*MIC najwyższy procent redukcji powstałego biofilmu wynosił 41% i uzyskano go dla ekstraktu CO₂ z konopi (CS). Dla ekstraktów UMS i SMS, w stężeniu 1*MIC wyniki procentowego usunięcia dojrzałego biofilmu były zbliżone, choć istotnie niższe w porównaniu do ekstraktu CS (odpowiednio: 37% i 35%). Najśłabszą wrażliwość, <5% usunięcia biofilmu przy zastosowaniu stężenia 1*MIC wykazano wobec ekstraktów WS i WF. Warto zauważyć, że nie zawsze zdolność hamowania biofilmu odzwierciedlała zdolność usuwania dojrzałego biofilmu, co widać szczególnie w przypadku ekstraktu SMO, który w stężeniu 1*MIC nie hamował wzrostu biofilmu, jednocześnie usuwając go ze skutecznością 29%.

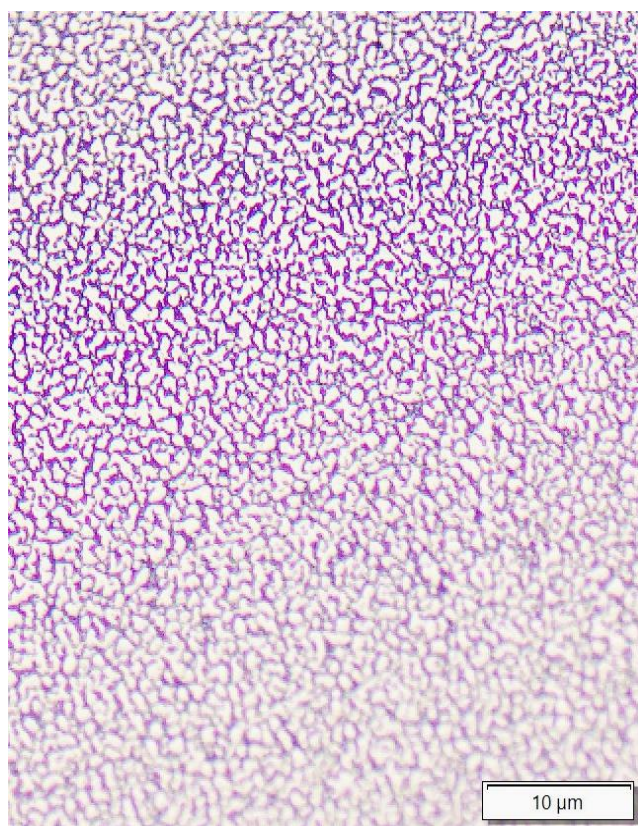


Wykres 6.3 Wpływ badanych ekstraktów roślinnych na formowanie biofilmu (1) oraz usuwanie dojrzałego biofilmu (2) wytworzonego przez bakterie *P. aeruginosa*

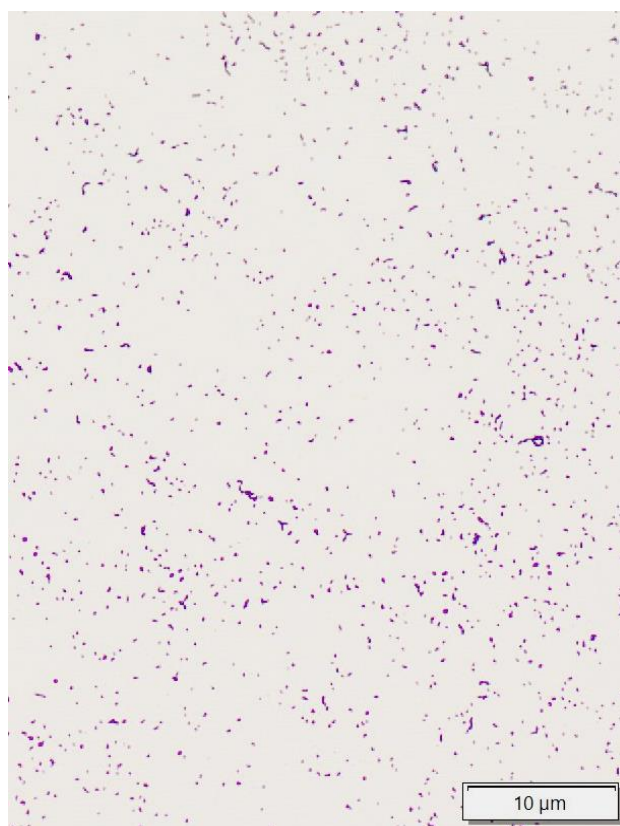
Wartości średnie procentowe, oznaczone różnymi literami (A-I) dla formowania biofilmu oraz oznaczone literami (a-g) dla usuwania dojrzałego biofilmu, różniły się między sobą istotnie ($p \leq 0,05$)

Źródło: opracowanie własne na podstawie badań

Biofilm utworzony przez bakterie *P. aeruginosa* okazał się najtrudniejszy do usunięcia przez badane ekstrakty roślinne, co było również widoczne na zdjęciach mikroskopowych (Fotografia 6.3.). Jak można zaobserwować, biofilm jest zwarty, nie widać dużych przestrzeni pomiędzy skupiskami komórek, a wizualny efekt usunięcia biofilmu jest słabszy, niż obserwowano w przypadku *L. monocytogenes* i *S. aureus*. W wyniku działania najsilniejszego ekstraktu (CS) uzyskano efekt rozbicia struktur biofilmu, niemniej widoczne są pojedyncze skupiska komórek przyklejonych do podłoża w znacznej liczbie.



a



b

Fotografia 6.3. Obraz mikroskopowy dojrzałego biofilmu bakterii *P. aeruginosa* przed (a) oraz po (b) zastosowaniu ekstraktu z konopi otrzymanego metodą ekstrakcji nadkrytycznym CO₂ (CS, stężenie 1*MIC = 0,25 mg/ml, redukcja 41%)

Źródło: opracowanie własne

Podsumowując wyniki badań nad właściwościami antybiofilmowymi ekstraktów należy stwierdzić, że nie wszystkie hamowały wzrost biofilmu bakteryjnego i usuwały jego struktury na poziomie zapewniającym bezpieczeństwo mikrobiologiczne. Można wskazać 6 ekstraktów charakteryzujących się wysokim stopniem zahamowania procesu formowania biofilmu przez badane mikroorganizmy: SMF, UFM, USMW, CS, SHF i SHO i USM, w przypadku których stopień hamowania w badanych stężeniach przekraczał 50%. Dane literaturowe potwierdzają możliwość hamowania procesu tworzenia biofilmu bakteryjnego przez ekstrakty roślinne (Rossi i in., 2016; Sandasi i in., 2010). Warto wspomnieć, że nie każda z bakterii charakteryzuje się jednakowym potencjałem do tworzenia biofilmu. Zdolność ta determinowana jest głównie przez ilość wytwarzanych EPS, czyli związków odpowiedzialnych za przyczepianie się komórek bakteryjnych do kolonizowanej powierzchni (Chavant i in., 2007). Najczęściej w badaniach dotyczących biofilmu jako mikroorganizmy modelowe wykorzystuje się bakterie: *B. cereus*, *C. jejuni*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. Enterica*, *S. aureus* i *P. aeruginosa* ze względu na udowodnioną zdolność do tworzenia takich struktur na różnych powierzchniach, między innymi w przemyśle spożywczym (Carrascosa i in., 2021).

Ze względu na różnorodne podejście metodyczne różnych autorów, w celu porównania wyników kierowano się procentowym hamowaniem biofilmu przy badanym stężeniu $1 \times \text{MIC}$, niezależnie od tego jaka była wartość MIC wyznaczona przez autora badań. Przykładowo, Bazargani i Rohloff (2016), ustalili, że przy wyznaczonym przez nich stężeniu $\text{MIC} = 4 \text{ mg/ml}$ olejków z oregano, zahamowanie formowania biofilmu *S. aureus* było na poziomie ponad 50%. Dla porównania, wyniki uzyskane przez Vidakovic i in., (2023) wskazują, że ekstrakt z oregano w $\text{MIC} = 0,09 - 0,72 \text{ } \mu\text{l/ml}$ hamował tworzenie się biofilmu *L. monocytogenes* w zakresie od 42% do 62% w zależności od wariantu pożywki oraz stężenia ekstraktów. Z kolei olejek konopny CBD badany przez Di Onofrio i in., (2019) hamował formowanie biofilmu *P. aeruginosa* aż w 70%, przy stężeniu $\text{MIC} = 0,153 \text{ mg/ml}$. Niestety w literaturze nie odnaleziono badań nad właściwościami antybiofilmowymi gojnika, które można byłoby porównać. Wielu autorów wskazuje natomiast właściwości antybiofilmowe różnych ekstraktów roślinnych. Przykładowo, w badaniach Al-Maqtari i in. (2020) ekstrakty uzyskane z *Artemisia arborescens*, *Artemisia abyssinica*, *Pulicaria jaubertii* i *Pulicaria petiolaris* były skuteczne w hamowaniu tworzenia biofilmu w stężeniu $1/2 \text{ MIC}$, przy czym największą skuteczność autorzy obserwowali w przypadku *B. subtilis*, natomiast najniższą

w przypadku *K. pneumoniae*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* i *E. faecalis*. Ponadto autorzy obserwowali hamowanie tworzenia biofilmu przez ekstrakty *P. jaubertii* i *P. petiolaris* w stężeniu 1/16 MIC z największą skutecznością wobec *B. subtilis*, a najniższą wobec *E. faecalis* i *L. monocytogenes*. Z kolei Abdullah i in. (2021) wskazali, że olejek eteryczny z zielonego kardamonu otrzymywany w drodze ekstrakcji w warunkach nadkrytycznych zapobiega tworzeniu się biofilmu przez bakterie *E. coli* O157:H7 i *S. typhimurium* JSG 1748.

Skuteczność usuwania dojrzałego biofilmu była mniejsza niż skuteczność hamowania tworzenia się biofilmu. Słabsza skuteczność usuwania biofilmu w porównaniu ze skutecznością jego hamowania na etapie formowania ma bezpośredni związek ze złożonością wielowarstwowej, adhezyjnej struktury biofilmu, której macierz chroni komórki żyjące wewnątrz poprzez utrudnione wnikanie substancji czynnych. Pomimo faktu, iż dowiedziono, że substancje roślinne skutecznie destabilizują struktury biofilmu dzięki zdolności dyfundowania do wnętrza matrycy polisacharydowej, skutkując wysoką wewnętrzną aktywnością przeciwdrobnoustrojową (Nostro i in., 2007), wyniki wskazują na dużą odporność struktur dojrzałego biofilmu bakterii Gram-ujemnych na działanie wybranych ekstraktów roślinnych z gojnika, oregano i konopi. W niniejszej pracy najwyższe wartości redukcji usuwania dojrzałego, dwudniowego biofilmu uzyskano dla ekstraktów CS i UMS, które usuwały biofilm utworzony przez *P. aeruginosa* i *S. aureus* odpowiednio w 37% i 76%. Zbliżone wyniki z zastosowaniem ekstraktów CBD uzyskali Di Onofrio i in., (2019), odnotowując 43% redukcji biofilmu *P. aeruginosa*, przy stężeniu MIC = 0,153 mg/ml. Z kolei Ben Abdallah, Lagha i Gaber (2020) wykazali zdolność olejków z oregano w niszczeniu dojrzałego biofilmu *S. aureus* na poziomie 60 - 76% przy zastosowaniu stężenia powyżej 3,125 mg/ml. Skuteczność niszczenia struktur biofilmu na poziomie nie przekraczającym 60% obserwowano również po zastosowaniu olejków z innych roślin, takich jak olejek drzewa herbacianego, eukaliptusowy czy cynamonowy (Hendry i in., 2009; Karpanen i in., 2008; Nuryastuti i in., 2009).

Podsumowując ten etap badań, należy stwierdzić, że najlepsze rezultaty, zarówno w odniesieniu do hamowania procesu tworzenia biofilmu, jak i jego redukcji, uzyskano po zastosowaniu ekstraktów z konopi, w tym CS, UMS i SMF. Porównując skuteczność ekstraktów pod względem metody ich otrzymywania, można zauważyć, że po zastosowaniu ekstraktów CO₂, jak również pozyskanych metodą ekstrakcji Soxhleta i ekstrakcji

wspomaganej ultradźwiękami (metanolowy i metanolowo-wodny) wyniki hamowania tworzenia biofilmu nie różniły się istotnie. Natomiast ekstrakty otrzymane na drodze hydrodestylacji nie zahamowały w 100% formowania się biofilmu żadnej z badanych bakterii nawet w stężeniu 2*MIC.

6.3. Opracowanie i ocena skuteczności formulacji środka dezynfekującego z wykorzystaniem ekstraktów roślinnych.

Na podstawie wyników badań uzyskanych na wcześniejszych etapach, wytypowano trzy ekstrakty roślinne charakteryzujące się największym potencjałem przeciwdrobnoustrojowym oraz antybiofilmowym (CS, UMS oraz SMF). Z ich wykorzystaniem stworzono propozycje formulacji środka dezynfekującego, przeznaczonego do użytku w przemyśle spożywczym. Jak zauważono na etapie badań nad właściwościami antybiofilmowymi, zastosowanie samych ekstraktów roślinnych jako czynnika blokującego formowanie biofilmu, a tym bardziej jako czynnika mającego redukować już powstałe struktury nie zawsze dawało zadowalające efekty. Wyniki wykazały wprawdzie, że wartości procentowego hamowania wzrostu biofilmu bakterii Gram-dodatnich kształtowały się na poziomie 100%, a usuwania dojrzałego biofilmu na poziomie bliskim 80%, jednakże w przypadku *P. aeruginosa* wyniki te były znacząco niższe i wynosiły odpowiednio: 76% i 49%. W związku z powyższym, uzasadnionym wyborem wydało się wykorzystanie etanolu jako nośnika związków roślinnych w proponowanej formulacji. Etanol miał spełniać zadanie podwyższenia potencjału antybiofilmowego ekstraktów w stężeniach bliskich wartości MIC (0,5-2*MIC). Nie była to jedyna przesłanka wykorzystania alkoholu etylowego. Ekstrakty, ze względu na swoją lepkość i gęstość nie rozpuszczały się w wystarczającym stopniu w wodzie, niezbędny był więc wybór dodatkowego rozpuszczalnika, który ponadto nie wykazuje znacznej toksyczności dla środowiska i ludzi i dobrze miesza się z wodą. Alkohol jest również substancją o wyższej lotności niż woda, co pozwala liczyć na efekt szybszego odparowania z powierzchni abiotycznych. Poniżej zamieszczono opis wariantów formulacji opracowanych w ramach eksperymentu oraz zaprezentowano wyniki badań nad ich skutecznością, według metody opisanej w normie PN-EN 13697+A1:2015.

6.3.1. Opracowanie składu formulacji

Zgodnie z procedurą OFAT rozpatrzono wszystkie możliwe kombinacje zmiennych niezależnych. Zmiennymi były: zawartość alkoholu etylowego w produkcie (30%, 40%, 50%);

stężenie ekstraktu: 0,5*MIC, 1*MIC i 2*MIC oraz wariant ekstraktu – do stworzenia formuacji produktu dezynfekującego wybrano trzy: CS, UMS i SMF – każdy pozyskany inną metodą, niemniej z tej samej rośliny – konopi (*C.S. Santhica i Futura*). Pozostałą część formuacji stanowiła woda destylowana. Łącznie otrzymano 27 różnych kombinacji, które poddano dalszym badaniom.

6.3.2. Skuteczność dezynfekcji z wykorzystaniem opracowanej formuacji zgodnie z normą PN-EN 13697+A1:2015

Skuteczność dezynfekcji każdego z przygotowanych wariantów została oceniona zgodnie z normą PN-EN 13697+A1:2015. Do badań wykorzystano cztery mikroorganizmy, w tym dwie bakterie Gram-dodatnie (*S. aureus i E. faecalis*) oraz dwie Gram-ujemne (*P. aeruginosa i E. coli*). Symulację skuteczności dezynfekcji prowadzono w wariancie „czystym” (z dodatkiem 0,3 g albuminy/l) oraz „brudnym” (3 g/l), mających odzwierciedlać rzeczywiste zanieczyszczenia w warunkach zakładów produkcyjnych. Norma nie precyzuje, który z wariantów powinien zostać zastosowany, ponieważ użytkownik sam powinien zdecydować, czy preparat dezynfekujący będzie wykorzystywany w środowisku z mniejszą czy większą ilością zanieczyszczeń organicznych. Norma wskazuje natomiast jednoznacznie, że za skuteczny uważa się środek dezynfekujący, w przypadku którego uzyska się redukcję minimum czterech wskazanych bakterii (*P. aeruginosa, E. coli, S. aureus i E. faecalis*) na poziomie > 4 jednostek logarytmicznych. Walidacja eksperymentu na etapie przygotowania zawiesin mikroorganizmów oraz zastosowania buforu neutralizującego każdorazowo przebiegła pomyślnie, spełniając warunki stawiane przez normę. Oznaczenia skuteczności badanych związków dokonano w temperaturze pokojowej 25°C, a czas kontaktu związków z dezynfekowaną powierzchnią ze stali nierdzewnej wynosił 1 x 5min.

W tabeli 6.16. przedstawiono wyniki skuteczności dezynfekcji uzyskane dla wszystkich przygotowanych formuacji. Zgodnie z wytycznymi normy dotyczącymi interpretacji uzyskanych wartości, spośród wariantów formuacji można wskazać te, które mogą zostać uznane za skuteczne środki dezynfekujące w przemyśle spożywczym.

Tabela 6.16. Wyniki skuteczności dezynfekcji proponowanych formułacji wyrażone jako logarytm dziesiętny redukcji w stosunku do kontroli wodnej.

		CS			UMS			SMF		
Stężenie ekstraktu/ Udział etanolu	R1/ R2*	0,5*MIC 0,125 mg/ml	1*MIC 0,25 mg/ml	2*MIC 0,5 mg/ml	0,5*MIC 2 mg/ml	1*MIC 4 mg/ml	2*MIC 8 mg/ml	0,5*MIC 1 mg/ml	1*MIC 2 mg/ml	2*MIC 4 mg/ml
S. aureus										
30%	R ₁	5,41	>7,04	>7,04	4,24	>6,62	>6,71	2,95	4,12	>6,04
	R ₂	5,35	>7,04	>7,04	4,12	>6,01	>6,21	2,43	3,86	>5,40
40%	R ₁	5,57	>7,04	>7,04	4,41	>6,71	>6,71	3,14	4,23	>6,10
	R ₂	5,55	>7,04	>7,04	4,20	>6,12	>6,35	2,54	3,90	>5,46
50%	R ₁	5,90	>7,04	>7,04	4,58	>6,71	>6,71	3,23	4,28	>6,41
	R ₂	5,74	>7,04	>7,04	4,33	>6,34	>6,71	2,60	3,94	>5,59
E. faecalis										
30%	R ₁	5,12	>6,54	>6,54	4,15	5,87	>6,28	2,74	3,71	4,21
	R ₂	4,88	>6,54	>6,54	4,07	5,74	>6,28	2,61	3,50	4,03
40%	R ₁	5,23	>6,54	>6,54	4,28	>6,28	>6,28	2,89	3,88	4,33
	R ₂	4,97	>6,54	>6,54	4,18	>6,28	>6,28	2,70	3,57	4,11
50%	R ₁	5,23	>6,54	>6,54	4,57	>6,28	>6,28	2,91	3,91	4,50
	R ₂	5,02	>6,54	>6,54	4,23	>6,28	>6,28	2,79	3,76	4,19
P. aeruginosa										
30%	R ₁	3,25	4,98	>6,20	2,45	4,08	>6,03	1,86	2,11	3,11
	R ₂	2,98	4,84	>6,11	2,18	3,76	5,89	1,67	1,94	2,87
40%	R ₁	3,41	5,23	>6,23	2,74	4,23	>6,03	1,97	2,38	3,25
	R ₂	3,12	5,21	>6,11	2,29	3,86	5,97	1,84	1,98	3,01
50%	R ₁	3,56	>6,12	>6,41	3,01	4,44	>6,03	2,18	2,59	3,46
	R ₂	3,12	5,89	>6,41	2,66	4,01	>6,03	2,00	2,08	3,27
E. coli										
30%	R ₁	3,61	5,01	>6,27	3,62	4,34	>6,41	2,11	2,11	3,28
	R ₂	3,25	4,68	>6,04	3,37	4,13	5,91	1,97	2,08	3,00
40%	R ₁	3,84	5,23	>6,27	3,78	4,39	>6,41	2,13	2,25	3,44
	R ₂	3,29	4,77	>6,27	3,39	4,20	>6,41	1,99	2,12	3,08
50%	R ₁	4,01	5,38	>6,27	3,90	4,49	>6,41	2,25	2,54	3,84
	R ₂	3,56	4,87	>6,27	3,54	4,32	>6,41	2,07	2,34	3,29

R₁ – wartość redukcji logarytmicznej w symulacji warunków czystych (stężenie albuminy bydlęcej 0,3 g/l)

R₂ - wartość redukcji logarytmicznej w symulacji warunków brudnych (stężenie albuminy bydlęcej 3 g/l)

Źródło: opracowanie własne

Stopień redukcji kształtował się w zakresie od 1,67 do ponad 7,04 jednostek log, w zależności od stężenia ekstraktu, udziału procentowego alkoholu etylowego oraz mikroorganizmu. Oczywistym wydaje się fakt, że im wyższe stężenie ekstraktu i alkoholu, tym wyższa redukcja liczby bakterii przy zachowaniu warunku stałości pozostałych zmiennych. W odniesieniu do prowadzonych badań istotne było natomiast to, czy zmiana ta była na tyle istotna, by uzasadniała wybór wyższego stężenia ekstraktu lub etanolu. Kluczowe było także ustalenie minimalnych stężeń ekstraktu i alkoholu jakie mogą zostać użyte do zapewnienia skutecznej eliminacji wszystkich mikroorganizmów wskaźnikowych. Zwiększenie udziału alkoholu etylowego w tworzonych formułacjach przekładało się na niewielkie różnice w wartościach redukcji wyrażonej w jednostce logarytmicznej. W zależności od bakterii i ekstraktu podniesienie udziału procentowego etanolu o 10 punktów procentowych skutkowało wyższą redukcją o 5 - 10%. Z kolei dwukrotne zwiększenie stężenia ekstraktu przekładało się na zwiększenie redukcji o 16 - 47%.

Porównując działanie przygotowanych formułacji można zauważyć, że stopień redukcji liczby bakterii wyrażony w jednostkach logarytmicznych dla ekstraktu CS wahał się od 2,98 wobec *P. aeruginosa* w warunkach brudnych, do >7,04 wobec *S. aureus* w warunkach czystych i brudnych. Wyniki otrzymane dla ekstraktu UMS były każdorazowo niższe i mieściły się w zakresie redukcji od 2,17 do > 6,17 jednostek logarytmicznych, natomiast najslabsze wyniki uzyskano przy wykorzystaniu formułacji z ekstraktem SMF (zakres redukcji od 1,67 do >6,41 log). Formułacje stworzone z wykorzystaniem ekstraktu CS w stężeniu 1*MIC i 2*MIC były skuteczne wobec każdej z bakterii niezależnie od warunków (czyste/brudne) i udziału etanolu. W przypadku formułacji z wykorzystaniem ekstraktu UMS zamierzoną skuteczność w stężeniu 1*MIC w stosunku do najtrudniej zwalczanej bakterii *P. aeruginosa*, uzyskano tylko w przypadku warunków czystych, przy czym były to wartości nieco powyżej 4 jednostek logarytmicznych. Oczekiwaną skuteczność w warunkach czystych i brudnych uzyskano natomiast przy użyciu stężenia 2*MIC. Formułacje z wykorzystaniem ekstraktu SMF nie spełniły wymogów normy stawianych środkom dezynfekującym nawet przy wykorzystaniu najwyższego stężenia ekstraktu i metanolu (wartości redukcji <4 log wobec bakterii Gram-ujemnych).

Przeprowadzony eksperyment wykazał, że formułacja stworzona z wykorzystaniem ekstraktu CS w stężeniu 0,25 mg/ml, przy 30% udziale etanolu jako rozpuszczalnika stanowi

skuteczną alternatywę dla popularnych środków dezynfekujących. Użycie wyższego stężenia ekstraktu lub etanolu jest w tym przypadku nieuzasadnione i nieekonomiczne. Formuła wykorzystująca w swoim składzie ekstrakt UMS może zostać uznana za skuteczną dopiero przy stężeniu ekstraktu na poziomie 8 mg/ml, przy 30% udziale etanolu lub 4 mg/ml przy 50% udziale etanolu. Obie formuły mogą być stosowane w przemyśle spożywczym jako alternatywa dla tradycyjnych środków dezynfekujących. Należy jednak zaznaczyć, że: chlor, PAA czy QAC mogą być stosowane w znacznie niższych stężeniach w granicach od 200 do 400 ppm, zachowując skuteczność dezynfekcji. Pod tym względem wyparcie tradycyjnych środków dezynfekujących przez alternatywne, takie jak formuły z ekstraktem CS lub UMS proponowane w niniejszej rozprawie, wydaje się mało prawdopodobne. Niemniej, jak wskazano w części teoretycznej, ważne jest stosowanie środków dezynfekujących o różnym mechanizmie działania, dlatego formuła z wykorzystaniem ekstraktów roślinnych mogłaby stanowić doskonałe uzupełnienie procesów dezynfekujących. Mogłoby to wpłynąć na ograniczenie występowania zjawiska uodpornienia mikroorganizmów na jednostajnie stosowane związki z tych samych grup chemicznych. Zjawisko to jest obserwowane szczególnie przy nadmiernym stosowaniu związków chloru. Należy również zaznaczyć, że w dzisiejszej zrównoważonej gospodarce, poza aspektami praktycznymi oraz ekonomicznymi, równie ważne są także kwestie społeczno - ekologiczne użytkowania środków dezynfekujących. Dlatego też, w ostatnim etapie badań, przeprowadzono analizę LCA wybranych formuły, w celu określenia ich obciążenia środowiskowego oraz porównaniu go do powszechnie stosowanych środków dezynfekujących takich jak podchloryn sodu, PAA czy PAA.

6.4. Ocena wpływu cyklu życia

W świetle wdrażania strategii Europejskiego Zielonego Ładu i dokonującej się transformacji ekologicznej (Rada Europejska, 2022), coraz większego znaczenia nabierają inicjatywy oraz narzędzia służące zapewnieniu zrównoważonych wzorców produkcji i konsumpcji. Celem wdrażania takich wzorców jest dokonywanie „czegoś lepiej i więcej przy użyciu mniejszych środków”, co powinno prowadzić do „zwiększenia korzyści netto z działalności gospodarczej poprzez zmniejszenie zużycia środków oraz zmniejszenia skali degradacji i zanieczyszczeń, jednocześnie poprawiając jakość życia” (Cele zrównoważonego rozwoju, 2019). Zgodnie z tą definicją, za zrównoważone można przyjąć te produkty, spełniające określone potrzeby

(funkcje) w sposób, który wiąże się z mniejszym negatywnym oddziaływaniem na środowisko. Oddziaływanie to powinno być zredukowane w perspektywie całego cyklu życia, co jest zgodne z koncepcją współczesnego ekoprojektowania (Navajas, Uriarte i Gandia; 2017). Najbardziej złożonym i kompleksowym narzędziem ekoprojektowym jest środowiskowa ocena cyklu życia, zwana w skrócie LCA (ang. *Life Cycle Assessment*) (Lindhal i Ekermann, 2013). LCA stanowi uznaną, znormalizowaną i opartą na nauce technikę zarządzania środowiskowego. Wymagania i wytyczne dotyczące realizacji analiz LCA zawarto w grupie norm ISO 14040x. LCA definiowane jest jako „zebranie i ocena wejść, wyjść oraz potencjalnych wpływów na środowisko systemu wyrobu w okresie jego cyklu życia” (ISO 14040: 2009 Zarządzanie środowiskowe - Ocena cyklu życia - Zasady i struktura #3.2). W ostatnim czasie zainteresowanie metodami pomiaru efektywności środowiskowej w cyklach życia produktów wyraźnie wzrasta, co jest związane z wdrażaniem inicjatyw legislacyjnych w zakresie europejskiego zielonego ładu np.: w zakresie projektowania zrównoważonych produktów (Komisja Europejska, 2022), uzasadniania oświadczeń środowiskowych (Komisja Europejska, 2023), czy też stosowania metod oznaczania śladu środowiskowego (Komisja Europejska, 2021).

Jak wspomniano na wcześniejszym etapie badań, stworzone formułacje mogą stanowić alternatywę w obszarze dezynfekcji dla najczęściej wybieranych środków chemicznych. Niemniej w świetle omawianej kwestii ekoprojektowania podjęto decyzję o określeniu oddziaływania na środowisko tego typu formułacji oraz porównaniu tego oddziaływania z tradycyjnymi środkami dezynfekującymi. Poniżej zaprezentowano wyniki oceny wpływu na środowisko po interpretacji dokonanej z wykorzystaniem procedury identyfikacji znaczących kwestii. W obliczeniach dotyczących stworzonych formułacji uwzględniono te stężenia ekstraktów, przy których uzyskiwano skuteczność dezynfekcji wg.: PN-EN 13697+A1:2015. Dla ekstraktów CS i UMS były to odpowiednio: 1*MIC i 2 *MIC, natomiast dla ekstraktu SMF wybrano najwyższe badane stężenie 2*MIC, choć warto przypomnieć, że nawet w tym stężeniu formułacja z tym ekstraktem nie była skuteczna wobec wszystkich bakterii wskaźnikowych. Uzyskane wyniki pozwoliły na wskazanie metody pozyskiwania ekstraktów roślinnych najmniej obciążającej środowisko, a także na zoptymalizowanie etapów produkcji tak, aby uzyskać efekt najmniejszego możliwego obciążenia środowiskowego.

6.4.1. Ocena oddziaływania na środowisko wariantu bazowego

Jak wspomniano w części metodycznej, za wariant bazowy w badaniu wybrano cykl życia formulacji środka dezynfekującego z ekstraktem SMF, rozpuszczonego w 50% alkoholu etylowym. Całkowite potencjalne oddziaływanie na środowisko (single score) związane z dezynfekcją 1 m² powierzchni w wariantie bazowym wyniosło 0,000072 Pt (Tabela 6.17.). Oddziaływanie to było generowane w głównej mierze w wyniki następujących kategorii wpływu: ekotoksyczność wód słodkich (30%), zmiany klimatu (13%), zużycie wody (8%), eutrofizacja (8%), zużycie materiałów kopalnych (7%), zakwaszenie gleby (7%) pyły (5%) i niekancerogenna toksyczność dla ludzi (5%). W kolejnym etapie, dla każdej ze znaczących kategorii wpływu wskazano istotne etapy cyklu życia najsilniej wpływające na wynik obciążenia środowiskowego. Etapy cyklu życia podzielono na: produkcję i użytkowanie. W czterech z siedmiu znaczących kategorii wpływu etap użytkowania odpowiadał za ponad 80% całego oddziaływania. W pozostałych trzech przypadkach, oprócz użytkowania, znaczący okazał się także etap produkcji.

Tabela 6.17. Identyfikacja środowiskowych punktów krytycznych związanych z cyklem życia - scenariusza bazowego (SMF, 50% etanolu, skala laboratoryjna produkcji)

Skumulowany ekowskaźnik single score (100%)	Jednostka	KROK 1		KROK 2	
		Znaczące kategorie wpływu (na podstawie wyników ważonych)	Udział [%]	Znaczące etapy cyklu życia (na podstawie wyników charakteryzowanych)	Udział [%]
0,000072	Pt	ekotoksyczność wód słodkich	30	Użytkowanie	92
		zmiany klimatu	13	Produkcja (skala lab)	69
				Użytkowanie	31
		zużycie wody	8	Użytkowanie	88
		eutrofizacja	8	Produkcja (skala lab)	90
		zużycie materiałów kopalnych	7	Produkcja (skala lab)	78
				Użytkowanie	22
		zakwaszenie gleby	7	Użytkowanie	59
				Produkcja (skala lab)	41
		niekancerogenna toksyczność dla ludzi	5	Użytkowanie	91
		pyły	5	Użytkowanie	82

Źródło: opracowanie własne

Dla czterech z siedmiu znaczących kategorii wpływu udział etapu użytkowania (zastosowanie) przekracza 50%. Z tego powodu procedura została powtórzona osobno dla produkcji i osobno dla pozostałych elementów związanych z zastosowaniem ekstraktu. Wyniki powtórzonej analizy dla produkcji zamieszczono w tabeli 6.18., natomiast dla pozostałych elementów użytkowania w tabeli 6.19.

Tabela 6.18. Identyfikacja środowiskowych punktów krytycznych związanych wyłącznie z etapem produkcji (krok 2 uproszczony) ekstraktu dezynfekującego na bazie konopi - scenariusz bazowy (SMF, 50% etanolu, skala laboratoryjna)

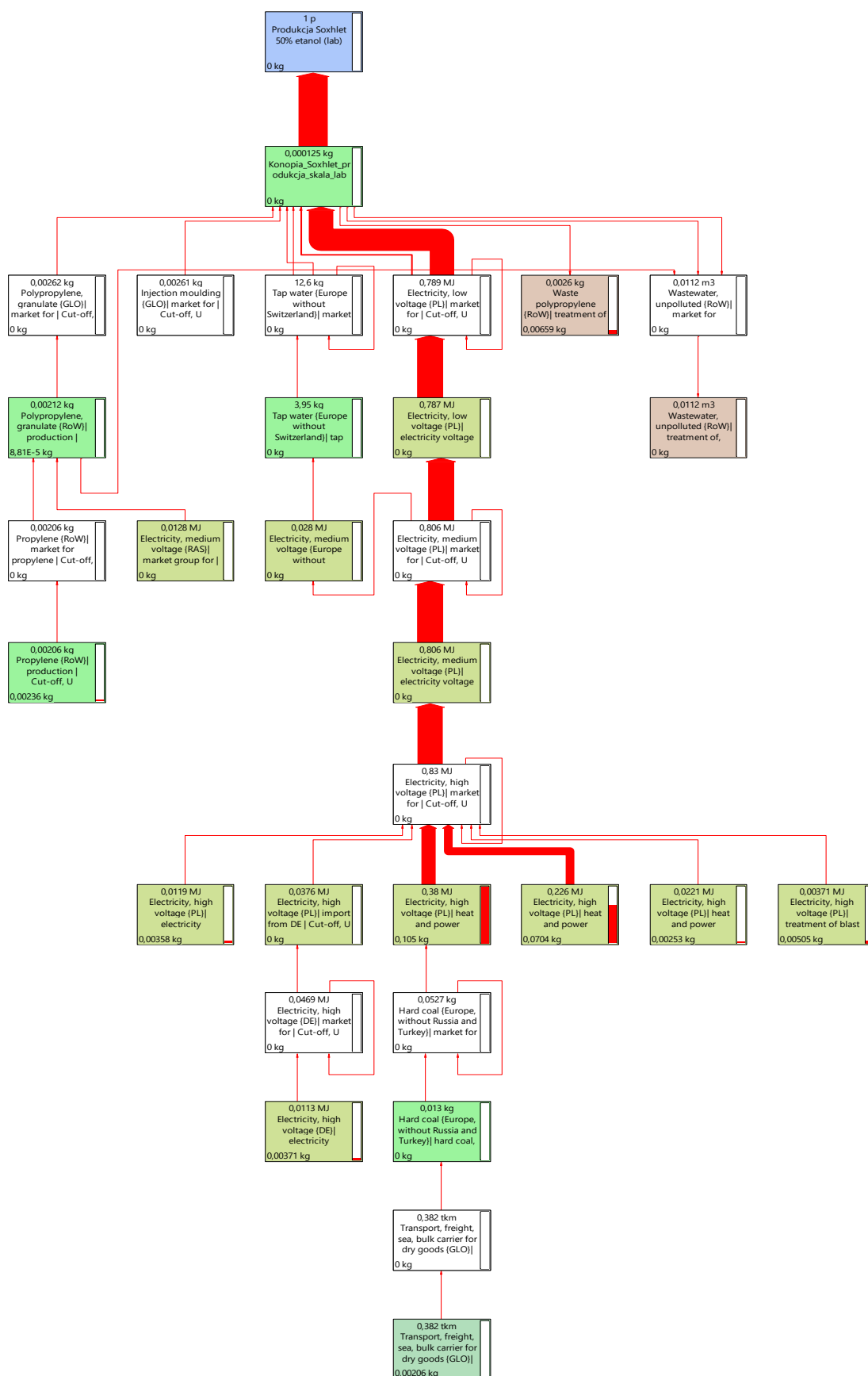
Skumulowany ekowskażnik single score 100% = 0,000024 Pt							
KROK 1		KROK 3		KROK 4			Miejsce w łańcuchu dostaw stanowiące źródło znaczących strumieni elementarnych
Znaczące kategorie wpływu (na podstawie wyników ważonych)	Udział [%]	Znaczące procesy (na podstawie wyników charakteryzowanych)	Udział [%]	Znaczące strumienie elementarne (na podstawie wyników charakteryzowanych)		Udział [%]	
Zmiany klimatu	28	Energia elektryczna wysokiego napięcia {PL} kogeneracja ciepła i energii, węgiel kamienny Cut-off, U	42	Dwutlenek węgla, kopalny	powietrze	92	elektrownie
		Energia elektryczna wysokiego napięcia {PL} kogeneracja ciepła i energii, węgiel brunatny Cut-off, U	28				
		Energia elektryczna wysokiego napięcia {PL} obróbka gazu wielkopieczowego w elektrowni Cut-off, U	2				
Eutrofizacja wód słodkich	22	Łup z wydobycia węgla brunatnego {GLO} obróbka na składowiskach powierzchniowych Cut-off, U	71	Fosforany	woda	100	kopalnie
		Łupki z wydobycia węgla kamiennego {GLO} obróbka na składowiskach powierzchniowych Cut-off, U	24				

Wykorzystywanie zasobów, surowce kopalne	16	Węgiel kamienny, eksploatacja kopalń węgla kamiennego i przeróbka węgla kamiennego	43	Węgiel kamienny	surowce	49	kopalnie
		Węgiel brunatny {RER} eksploatacja kopalni Cut-off, U	22	Węgiel brunatny	surowce	28	
		Propylen {RoW} produkcja Cut-off, U	5	Gaz ziemny/m³	surowce	10	
		Gaz ziemny pod wysokim ciśnieniem {RU} produkcja gazu ziemnego Cut-off, U	4				
Zakwaszenie	8	Energia elektryczna wysokiego napięcia {PL} kogeneracja ciepła i energii, węgiel kamienny Cut-off, U	45	Dwutlenek siarki	powietrze	77	elektrownie
		Energia elektryczna wysokiego napięcia {PL} kogeneracja ciepła i energii, węgiel brunatny Cut-off, U	30	Tlenki azotu	powietrze	21	
		Transport towarowy, morski, masowiec do towarów sypkich {GLO} Cut-off, U	4				
Ekotoksyczność dla wody słodkiej	7	Obróbka strumieniowo-ścierna	68	Aluminium	powietrze	69	kopalnie oraz elektrownie
		Popiół z węgla kamiennego {RoW} przetwarzanie, składowanie pozostałości materiałów Cut-off, U	4	Aluminium	woda	11	
		Węgiel kamienny {CN} Eksploatacja kopalni węgla kamiennego i przeróbka węgla kamiennego Cut-off, U	3	Aluminium	gleba	7	

źródło: opracowanie własne

Wyniki zaprezentowane w tabeli 6.18. pozwalają na wnioskowanie, iż biorąc pod uwagę etap produkcji istnieje jedno główne źródło oddziaływania na środowisko związane z procesem wytwarzania ekstraktu w wariantie bazowym - jest nim energia elektryczna zużywana w procesach laboratoryjnych. Oddziaływanie to ma wieloaspektowy charakter i jest pochodną struktury miksu energetycznego dla Polski (opartego na nośnikach kopalnych). Poniżej, dla wybranych emisji, zamieszczono wykresy strumieniowe pokazujące udział poszczególnych procesów składających się na łączne emisje na etapie produkcji wariantu bazowego formulacji środka dezynfekującego. Ilościowo, realizacja procesów związanych z wytwarzaniem ekstraktu w wariantie bazowym, w odniesieniu do poszczególnych znaczących kategorii wpływu wiąże się z:

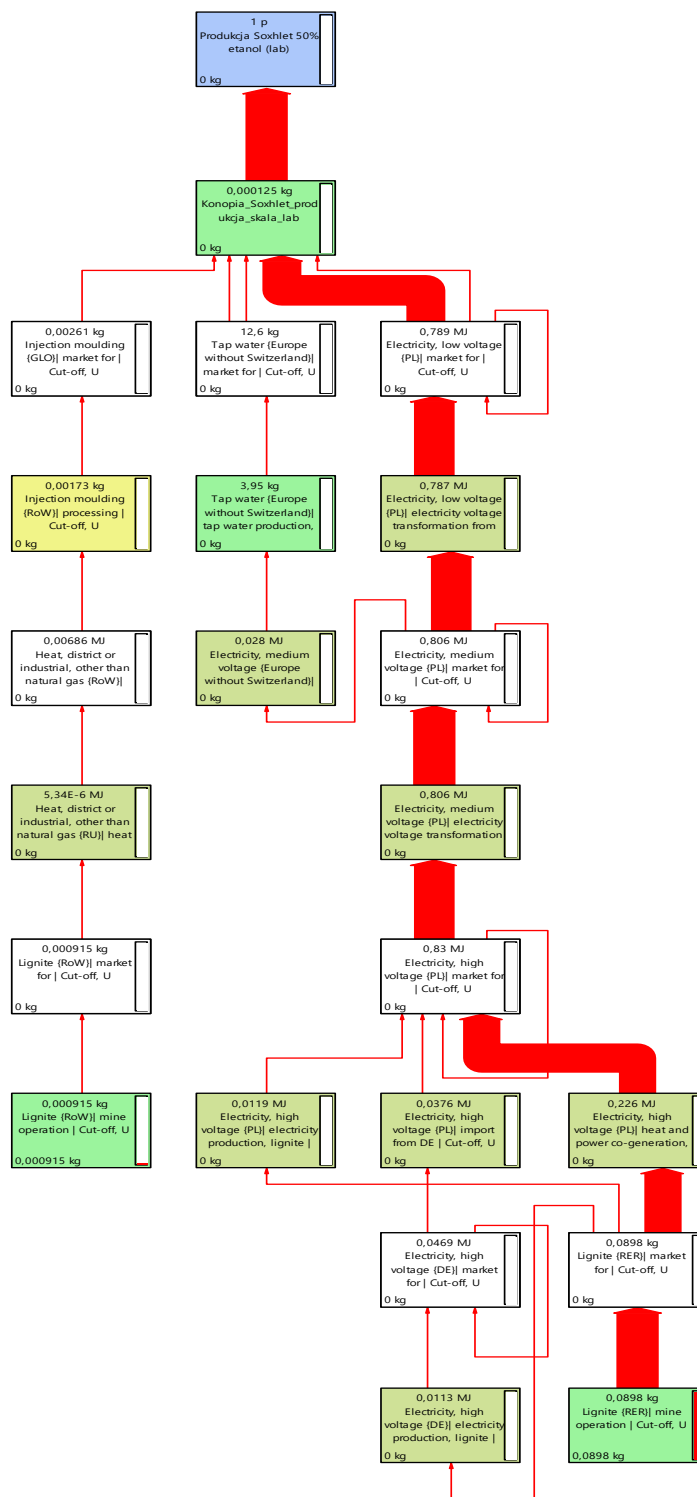
- emisją 0,000893 kg fosforanów do wody (w przeliczeniu na JF), z czego 96% przypada na emisje w kopalniach węgla z racji składowania odpadów górniczych (składy płonnej) – **kategoria wpływu: eutrofizacja,**
- emisją 0,232 kg kopalnego CO₂ do powietrza (w przeliczeniu na JF), z czego 80,4% to emisje zachodzące w elektrowniach węglowych podczas generowania energii (spalania węgla) (Rysunek 6.1.) – **kategoria wpływu: zmiany klimatu,**



Rysunek 6.1. Emisja kopalnego CO₂ do powietrza (wynik LCI, 5% odcięć, bez sumowania)

źródło: SimaPro, opracowanie własne

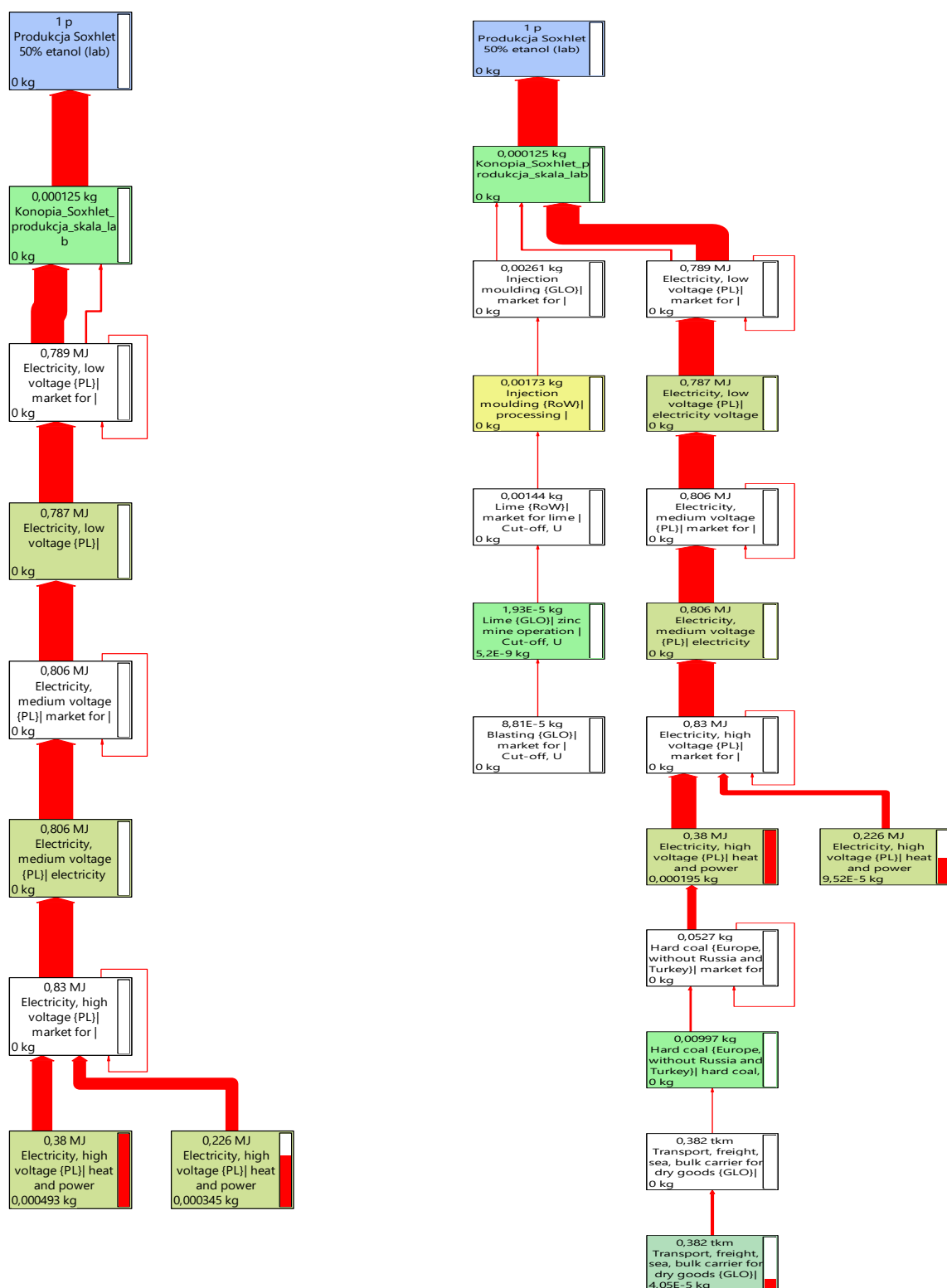
- wydobyciem 0,0769 kg węgla kamiennego/JF (96% wydobyte w kopalniach na potrzeby energii elektrycznej), 0,0908 kg węgla brunatnego/JF (całość zużywana do produkcji energii elektrycznej), 0,00821 m³ gazu ziemnego (43% na potrzeby produkcji energii) – (Rysunek 6.2.) - **kategoria wpływu: zużycie zasobów naturalnych,**



Rysunek 6.2. Wydobycie węgla kamiennego (wynik LCI, 5% odcięć, bez sumowania)

źródło: SimaPro, opracowanie własne

- emisją do powietrza 0,00103 kg SO₂ (z czego 81% to emisja w elektrowniach) oraz 0,000488 kg NO_x (60% emisje w elektrowniach) – (Rysunek 6.3.) **kategoria wpływu: zakwaszenie,**

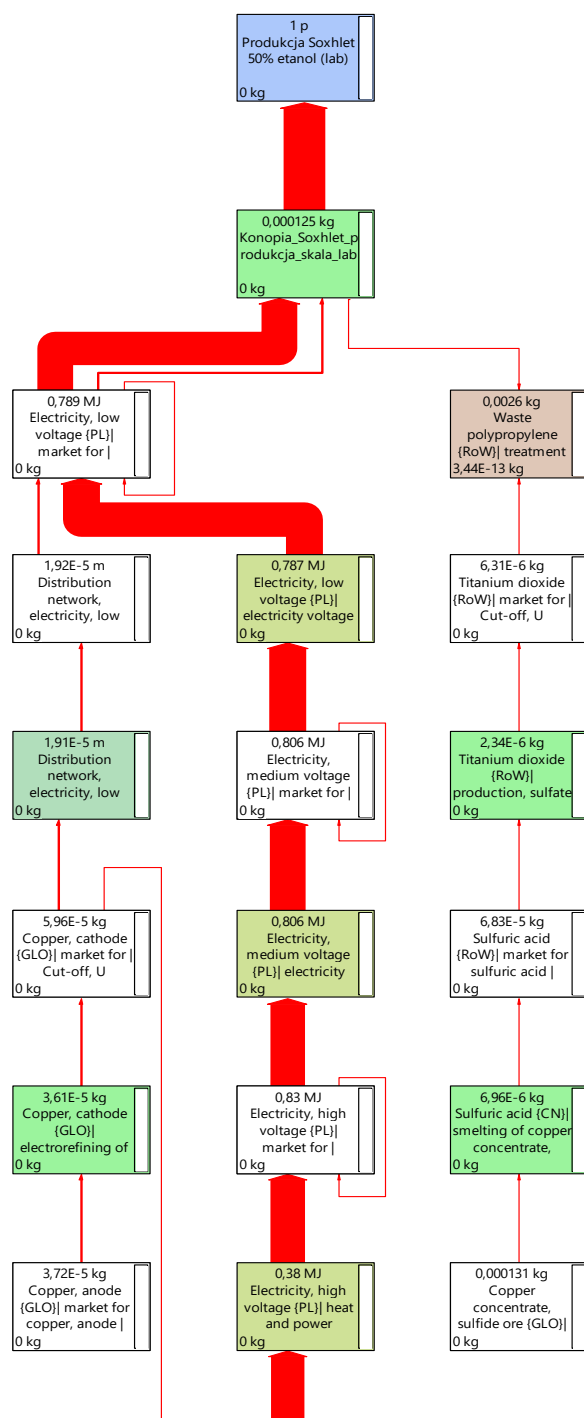


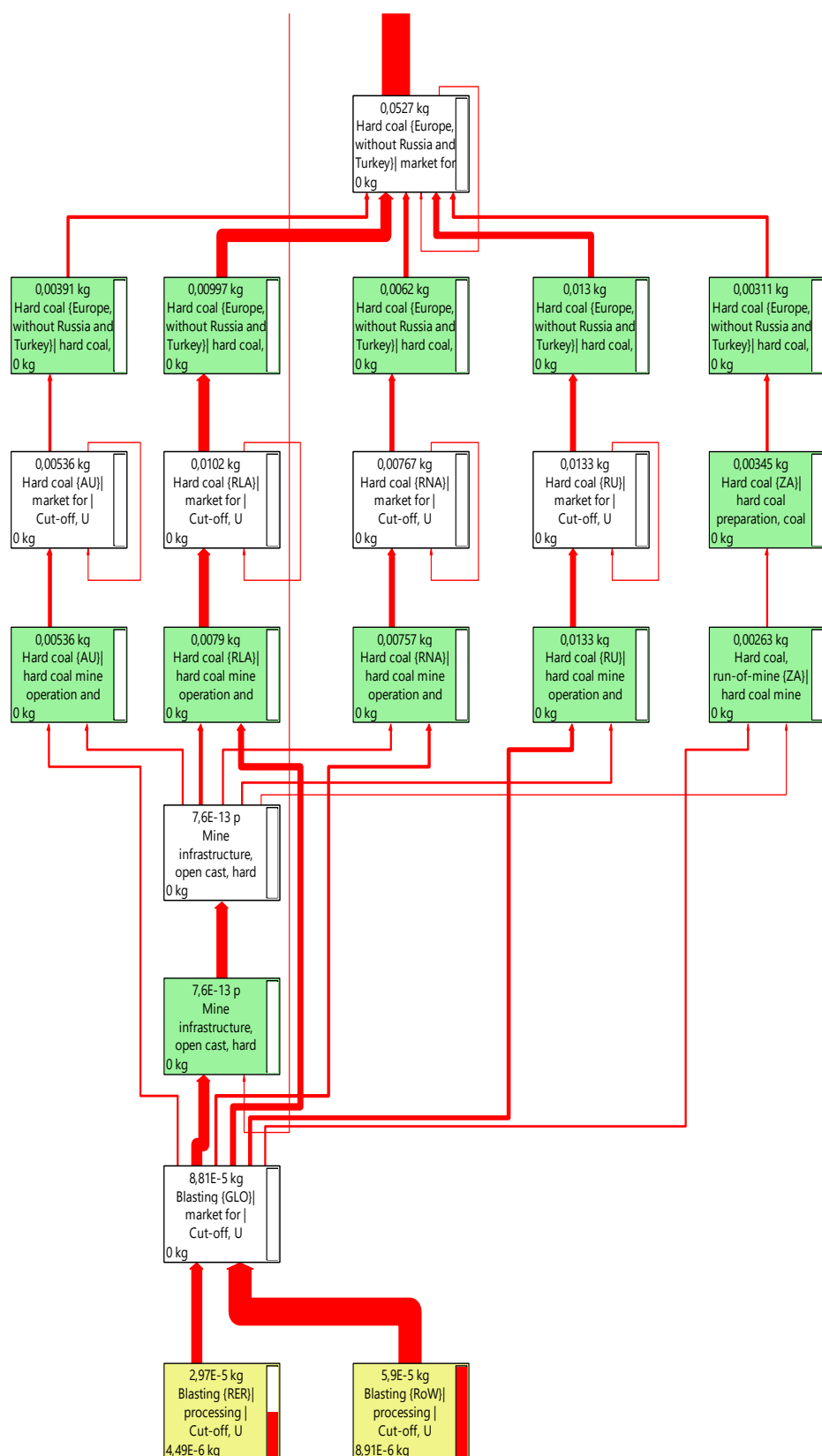
Rysunek 6.3. Emisja SO₂ i NO_x do powietrza (wynik LCI, 5% odcięć, bez sumowania)

źródło: SimaPro, opracowanie własne

- emisją 0,0000137 kg aluminium do powietrza (97% to emisje podczas robót strzałowych w kopalniach) , 0,000681 kg aluminium do wody (50% to emisje w elektrowniach z racji zagospodarowania popiołów po spalaniu węgla a 10% do kopalnie i roboty strzałowe) oraz 0,000000961 kg do gleby (35% wynika z działalności kopalń) – (Rysunek 6.4.)

kategoria wpływu: toksyczność wód słodkich.





Rysunek 6.4. Emisja aluminium do powietrza (wynik LCI, 5% odcięć, bez sumowania)

źródło: SimaPro, opracowanie własne

Spalanie paliw kopalnych w elektrowniach przyczynia się do emisji do powietrza kopalnego CO₂ (zmiany klimatu), SO₂ oraz NO_x (zakwaszenie), a także emisji aluminium do wody (ekotoksyczność wód słodkich). Działalność kopalń węgla przyczynia się natomiast do zubożenia zasobów kopalnych (głównie węgla kamiennego i brunatnego), emisji fosforanów do wody (składowanie skały płonnej), a także emisję aluminium (tzw.: roboty strzałowe).

Przechodząc do etapu użytkowania w scenariuszu bazowym na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono, że podobnie jak w przypadku etapu produkcji istnieje jedno główne źródło oddziaływania na środowisko, jednakże źródło jest zupełnie odmienne - jest nim łańcuch dostaw etanolu, w którym rozpuszczany jest ekstrakt konopny (w wariancie bazowym 4 g ekstraktu rozpuszczane w 0,18936 kg etanolu). Etanol jest substancją chemiczną pochodzenia rolniczego - w globalnym (świat bez Brazylii, ROW) miksie technologicznym niemal 90% etanolu produkowane jest z trzciny cukrowej. Oddziaływanie na środowisko uprawy trzciny ma złożony charakter. Z jednej strony są to emisje do gleby wynikające ze stosowania środków ochrony roślin (fipronil, aldrin, arsen), a z drugiej strony emisje do powietrza z racji stosowania nawozów sztucznych (amoniak, NO_x) oraz emisje kopalnego CO₂ (spalanie paliw w maszynach rolniczych, przekształcanie terenu). Innym znaczącym źródłem z punktu widzenia toksyczności jest emisja bezpośrednia etanolu do wody podczas procesu dezynfekcji. Wyniki podsumowujące analizy krytycznych punktów zamieszczono w tabeli 6.19.

Tabela 6.19. Identyfikacja środowiskowych punktów krytycznych związanych wyłącznie z etapem użytkowania (krok 2 uproszczony) środka dezynfekującego na bazie konopi - scenariusz bazowy (Soxhlet, 50% etanolu, skala laboratoryjna)

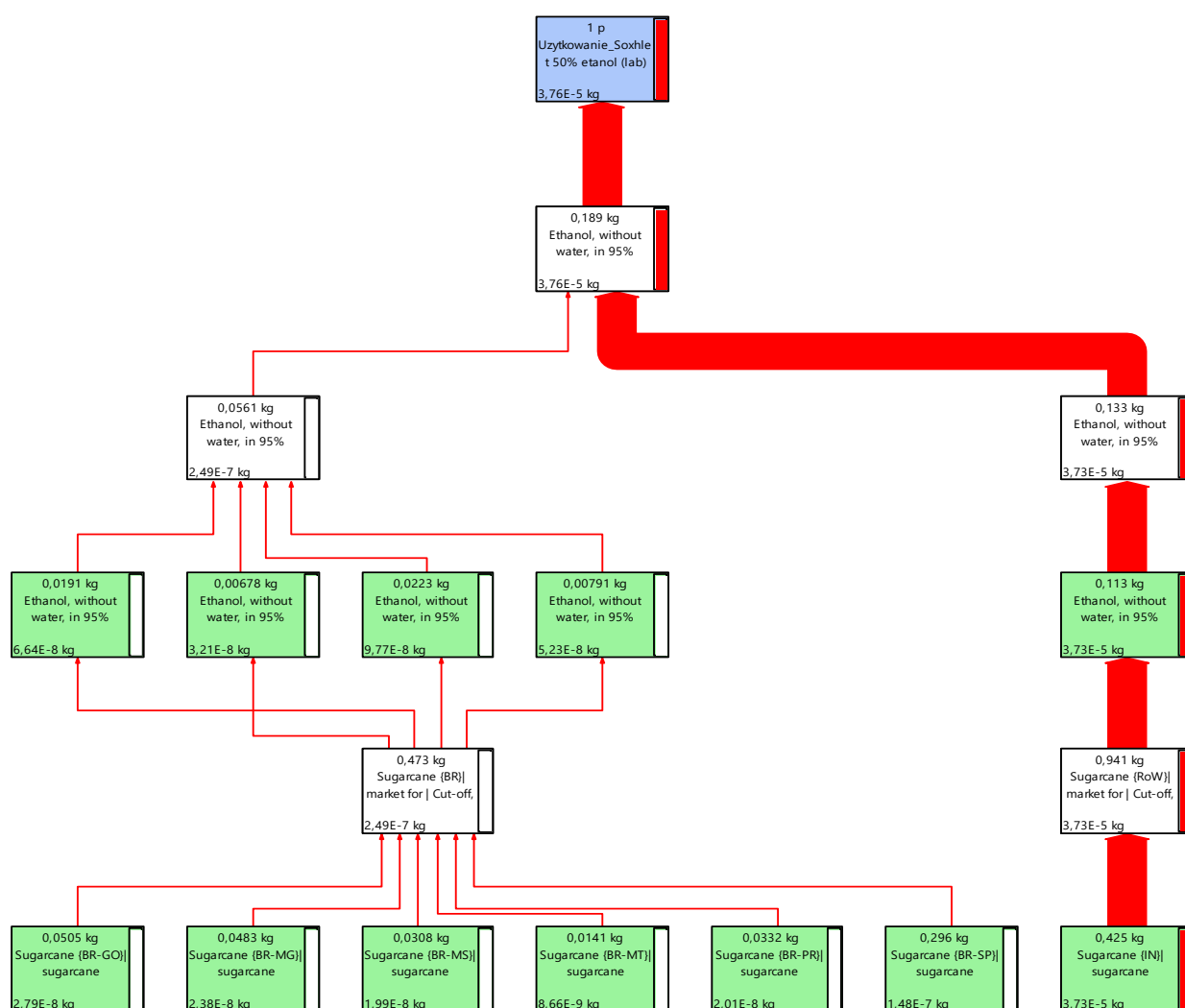
skumulowany ekowskażnik single score (100%) = 0,000048 Pt					
KROK 1		KROK 3		KROK 4	
Znaczące kategorie wpływu (na podstawie wyników ważonych)	Udział [%]	Znaczące procesy (na podstawie wyników charakteryzowanych)	Udział [%]	Znaczące strumienie elementarne (na podstawie wyników charakteryzowanych)	Udział [%]
Ekotoksyczność dla wód słodkich	42	Trzcina cukrowa {IN}] produkcja trzciny cukrowej Cut-off, U	74	Fipronil	gleba 69
				Siarka	Woda 8

		formulacja SMF 50% etanol emisje podczas procesu dezynfekcji	8	Etanol	Woda	8
Zużycie wody	11	Nawadnianie powierzchniowe	49	Woda (wejście)	surowce	53
		Produkcja trzciny cukrowej	28	Woda (wyjście)	woda	47
		Nawadnianie zraszaczami	11			
Działanie toksyczne dla ludzi - inne niż rakotwórcze	7	Produkcja trzciny cukrowej {RoW} Cut-off, U	68	Tlenek węgla, biogeny	Powietrze	44
				Fipronil	Gleba	18
		Produkcja trzciny cukrowej {IN} Cut-off, U	22	Arsen	Gleba	15
				Aldrin	Gleba	11
Zmiana klimatu	6	Produkcja trzciny cukrowej	37	Dwutlenek węgla, kopalny	Powietrze	35
		Własność gruntów, grunty orne, mierzone jako pierwotna produktywność netto emisji dwutlenku węgla, rośliny wieloletnie {BR}, grunty już użytkowane, pastwiska, uprawy wieloletnie stworzone przez człowieka	12	Dwutlenek węgla, przekształcanie gruntów	Powietrze	26
		Ciepło, sieciowe lub przemysłowe, gaz ziemny, produkcja ciepła	4	Podtlenek diazotu	Powietrze	17
		Produkcja amoniaku	3	Dwutlenek węgla do gleby lub zasobów biomasy	Gleba	14
Zakwaszenie	6	Produkcja trzciny cukrowej	66	Amoniak	Powietrze	78
		Produkcja kukurydzy	8	Tlenki azotu	Powietrze	14
		Etanol bez wody, 95% r-r z fermentacji {RoW} przetwórstwo trzciny cukrowej, tradycyjny zakład Cut-off, U	2			
Cząstki stałe	6	Produkcja trzciny cukrowej	64	Amoniak	Powietrze	76
		Produkcja ziaren kukurydzy	10			
		Etanol bez wody, 95% r-r z fermentacji {RoW} przetwórstwo drewna, tradycyjny zakład Cut-off, U	2	Cząstki stałe, < 2.5 um	Powietrze	15
		Burak cukrowy, produkcja buraków cukrowych	2			
Działanie toksyczne dla ludzi - rakotwórcze	5	Produkcja trzciny cukrowej {RoW} Cut-off, U	71	Aldrin	Gleba	66
		formulacja SMF 50% etanol emisje podczas procesu dezynfekcji	18	Etanol	Woda	18

źródło: opracowanie własne

Rozpatrując ilościowo poszczególne strumienie elementarne, z podziałem na znaczące kwestie wpływu, realizacja procesów związanych z użytkowanie wariantu bazowego wiąże się z:

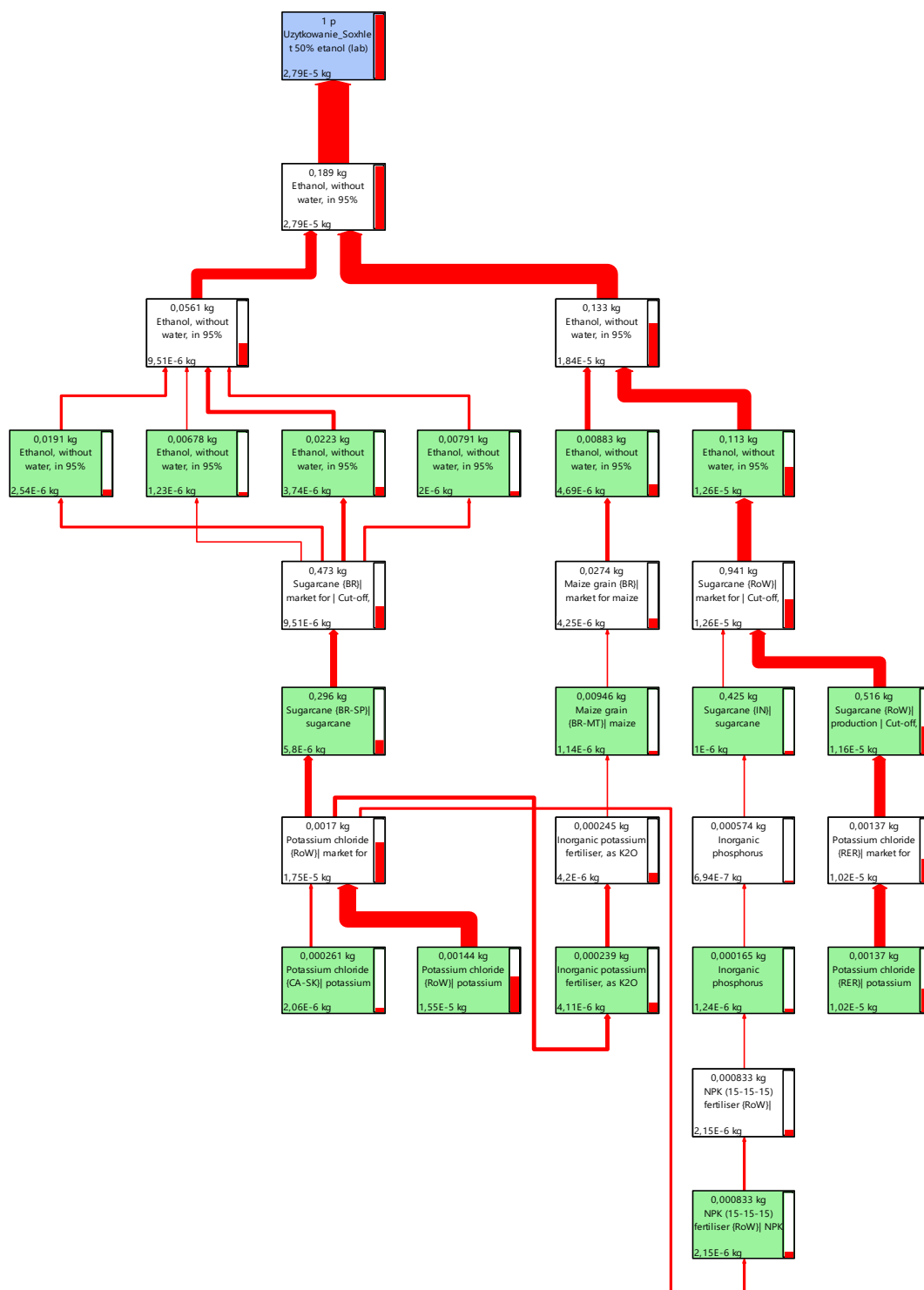
- emisją fipronilu do gleby - całkowita ilość emitowanego do gleby fipronilu wynosi 0,0000376 kg/JF i wynika ze stosowania tej substancji jako środka ochrony roślin w uprawie trzciny cukrowej, głównie w Indiach, gdyż jego stosowanie w krajach UE jest zabronione. Etanol to emisja bezpośrednia do wody następująca podczas stosowania środka dezynfekującego (0,18936kg/JF) – (Rysunek 6.5), – **kategoria wpływu: ekotoksyczność wód słodkich**



Rysunek 6.5. Fipronil do gleby, LCI, odcięcie 0,01%, bez sumowania

Źródło: SimaPro, opracowanie własne

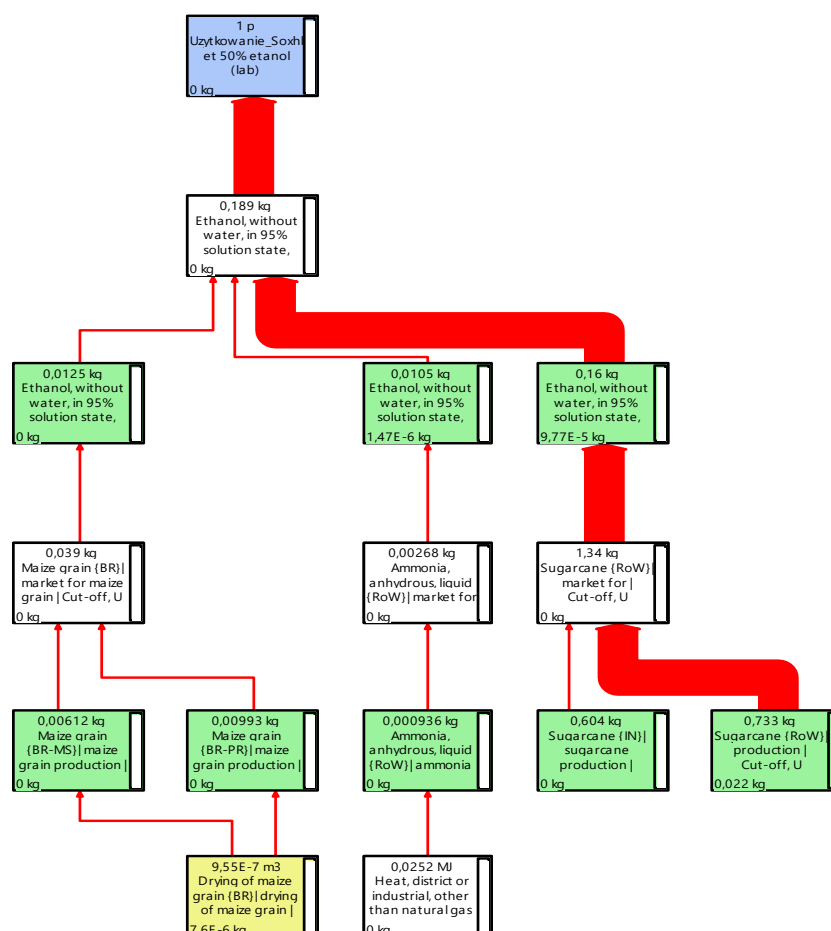
- emisją siarki do wody - całkowita ilość emitowanej siarki do wody wynosi 0,0000279 kg/JF, z czego niemal całość następuje w procesie produkcji chlorku potasu, jako składnika wykorzystywanego potem do wytwarzania nawozów potasowych – (Rysunek 6.6.), – kategoria wpływu: ekotoksyczność wód słodkich



Rysunek 6.6. Siarka do wody, LCI, odcięcia 4%, bez sumowania

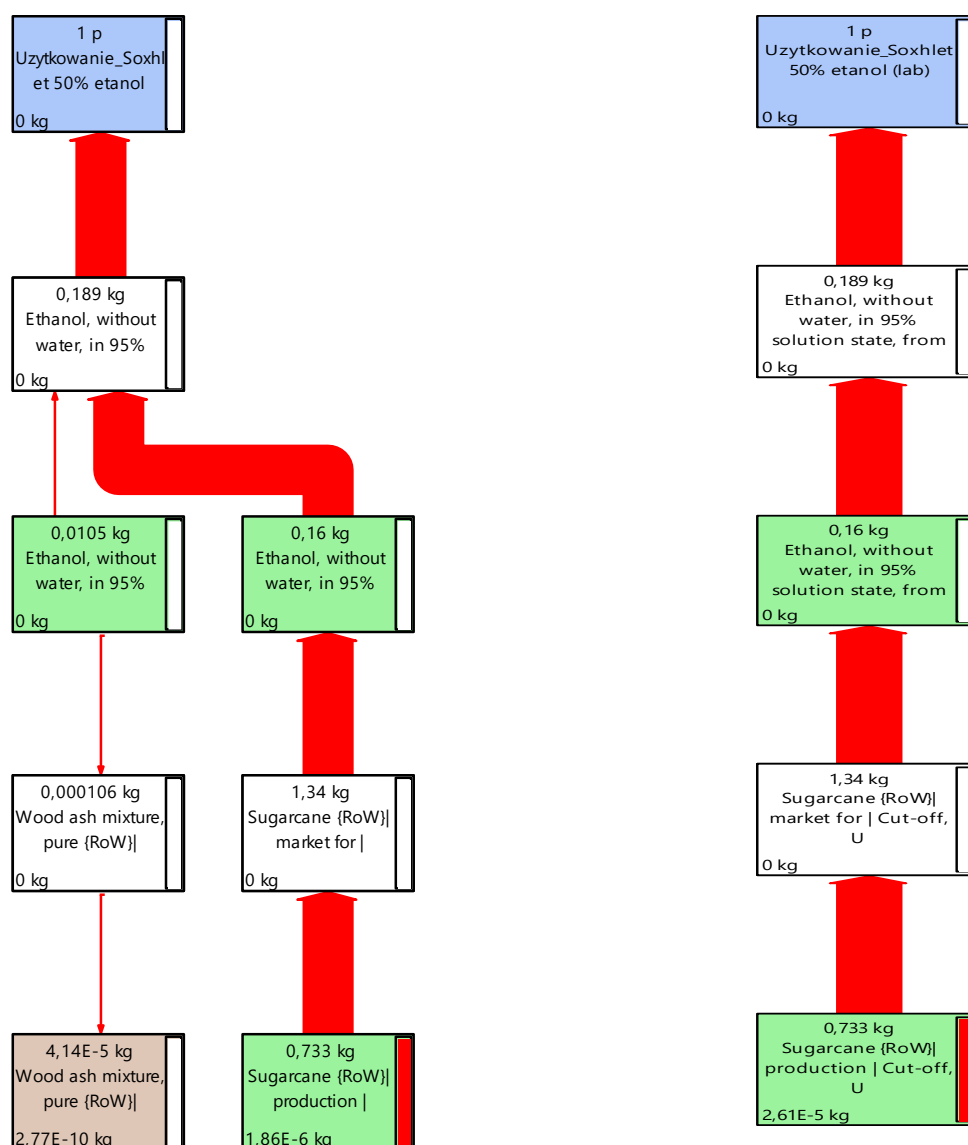
Źródło: SimaPro, opracowanie własne

- zużyciem wody do rozcieńczenia ekstraktu (tylko 1,61% oddziaływania w tej kategorii wpływu), korzyść środowiskowa wynika z racji oczyszczania ścieków i wpuszczania oczyszczonej wody do środowiska. Głównym źródłem poboru wody jest natomiast nawadnianie pól uprawnych trzciny cukrowej (powierzchniowe oraz kropelkowe), udział 53%. Jednocześnie rośliny nie wchłaniają całości wody przeznaczanej do nawadniania i znaczna jej część zostaje oddana środowisku. Stanowi to źródło korzyści środowiskowej (46%), – **kategoria wpływu: zużycie wody**
- emisją biogenicznego CO₂ (Rysunek 6.7.) – wynika ona z wypalania pól uprawnych (ściernisk) jako zabiegu przygotowującego do uprawy (0,402kg/JF). Emisje fipronilu (0,000053kg/JF), arsenu (0,00000186kg/JF) oraz aldrinu (0,0000261kg/JF) wynikają ze stosowania środków ochrony roślin w uprawie trzciny cukrowej, - (Rysunki: 6.8. i 6.9.)– **kategoria wpływu: niekancerogenna toksyczność dla organizmu ludzkiego**



Rysunek 6.7. emisja biogenicznego CO₂ do powietrza, LCI, bez sumowania

Źródło: SimaPro, opracowanie własne



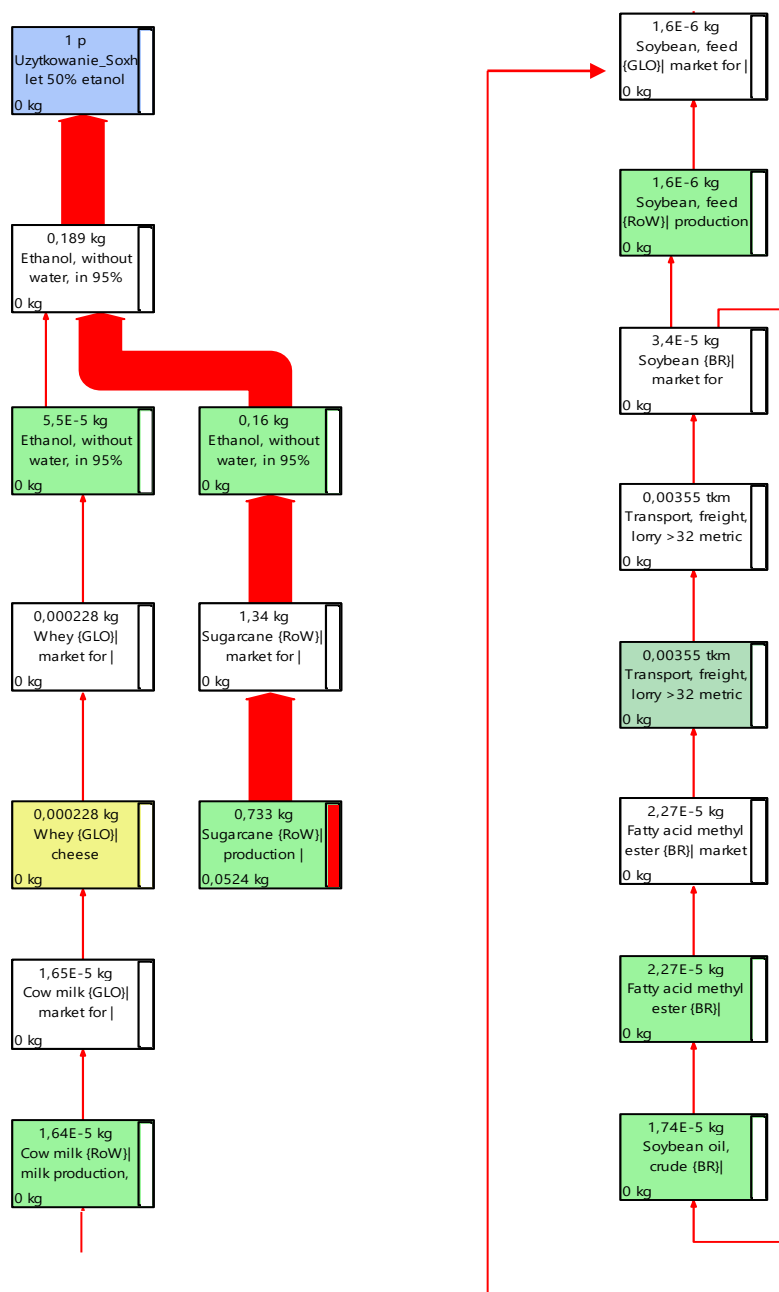
Rysunek 6.8 i 6.9. Arsen (z lewej) i aldrin (z prawej) do gleby, LCI, bez sumowania

źródło: SimaPro, opracowanie własne

- emisją kopalnego CO₂ – źródłem są procesy w łańcuchu dostaw etanolu: spalanie oleju napędowego w maszynach rolniczych (uprawa trzciny cukrowej), generowanie ciepła procesowego (produkcja etanolu) oraz emisje produkcyjne podczas produkcji amoniaku (produkcja mocznika jako nawozu). Całkowita wielkość emisji kopalnego CO₂ do powietrza związanej z użytkowaniem wynosi 0,0561 kg/JF.

- emisje CO₂ wynikające z użytkowania i przekształcania terenu na cele rolnicze (0,0404 kg/JF). Na trzecim miejscu jest emisja podtlenku azotu (0,0261 kg) następująca głównie podczas uprawy trzciny cukrowej. Wartym uwagi jest także udział upraw wieloletnich w magazynowaniu węgla w glebie, co stanowi korzyść środowiskową (-0,0224kg CO₂/JF),

- Rysunek 6.10. – kategoria wpływu: zmiany klimatu

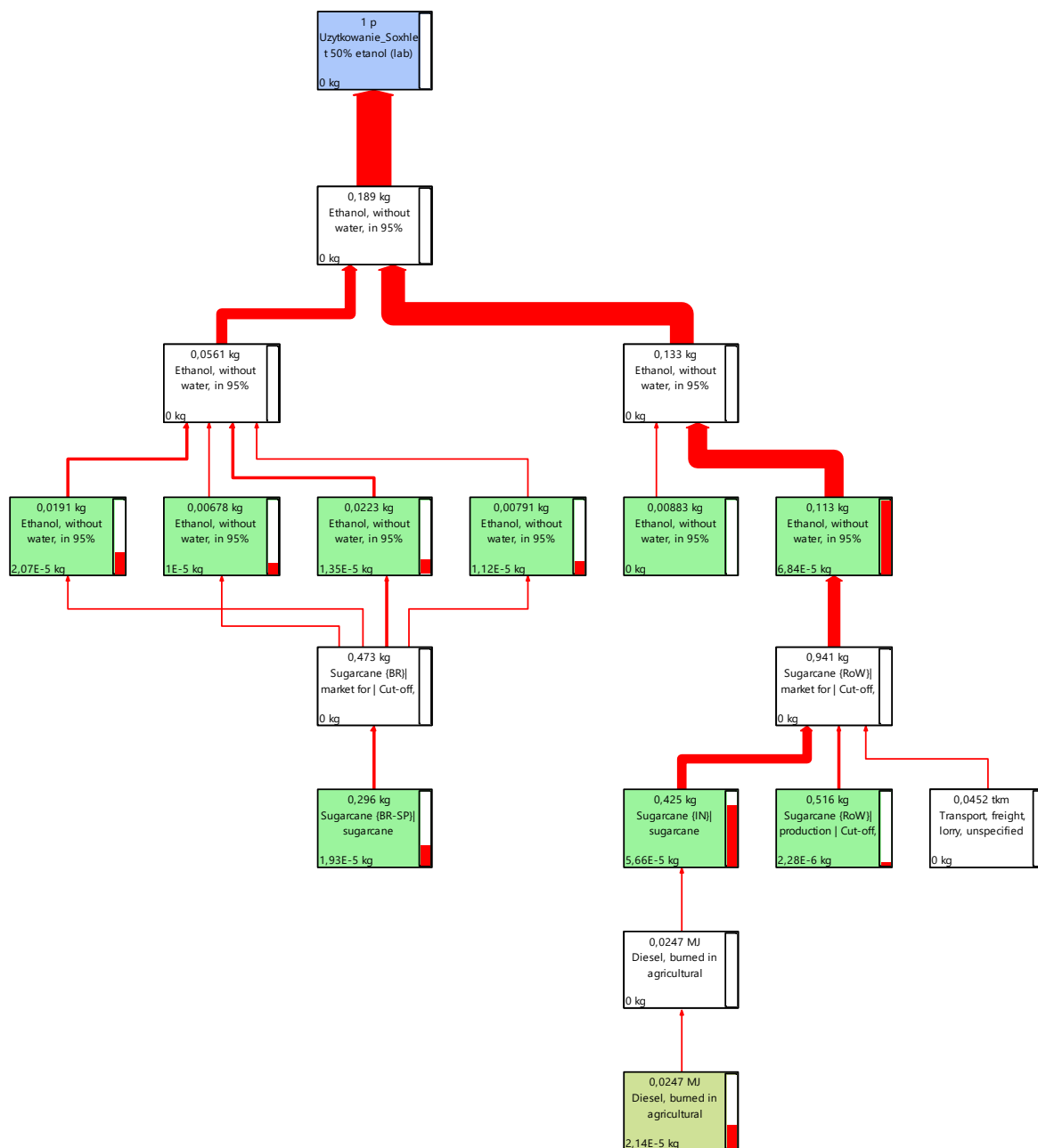


Rysunek 6.10. Dwutlenek węgla, przekształcenie gruntów, LCI, odcięcia 5%, bez sumowania

źródło: SimaPro, opracowanie własne

- emisję amoniaku oraz NO_x do powietrza - Całkowita ilość emitowanego amoniaku do powietrza wynosi 0,000643 kg/JF, natomiast NO_x 0,000452kg/JF. Stanowią one emisje bezpośrednie na polu uprawnym z tytułu wykorzystywania nawozów azotowych, –

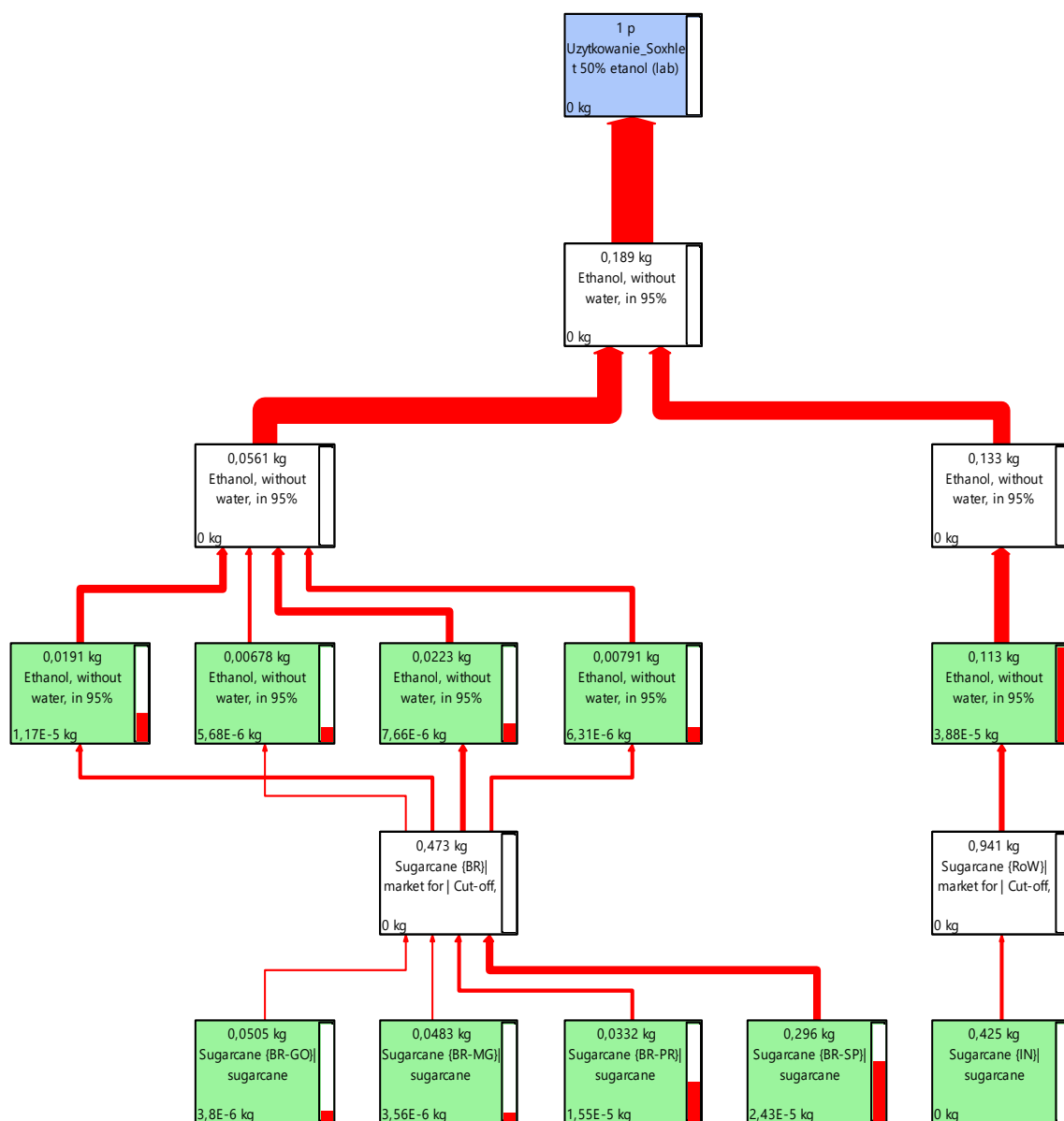
Rysunek 6.11. - **kategoria wpływu: zakwaszenie**



Rysunek 6.11. NO_x do powietrza, LCI, bez sumowania

źródło: SimaPro, opracowanie własne

- emisję amoniaku oraz pyłu drobnego do powietrza - całkowita ilość emitowanego amoniaku do powietrza wynosi 0,000643 kg/JF, natomiast pyłu drobnego 0,000168 kg/JF. Pierwsze to emisje bezpośrednie na polu uprawnym z tytułu wykorzystywania nawozów azotowych, a emisja pyłów następuje głównie podczas produkcji samego etanolu, – Rysunek 6.12. - **kategoria wpływu: pyły**



Rysunek 6.12. Pyły poniżej 2.5um do powietrza, LCI, 4% odcięcia, bez sumowania

źródło: SimaPro, opracowanie własne

- emisją do gleby aldrinu (0,0000184 kg/JF). Wynika ona ze stosowania środków ochrony roślin w uprawie trzciny cukrowej. Etanol to emisja bezpośrednia do wody następująca podczas stosowania środka dezynfekującego (0,18936kg), – **kategoria wpływu: toksyczność kancerogenna dla organizmu ludzkiego.**

Przeprowadzona analiza punktów krytycznych dla wariantu bazowego pozwoliła na sformułowanie rekomendacji dotyczących tworzenia formułacji produktu do dezynfekcji tak, aby jego skumulowany ekowskażnik osiągnął możliwie jak najmniejszy wynik, co bezpośrednio wiąże się ze zmniejszeniem obciążenia środowiskowego autorskiej formułacji produktu dezynfekującego. Proponowane rozwiązania, wnioski oraz wyniki zamieszczono poniżej.

6.4.2. Scenariusze alternatywne, porównanie oraz wnioski

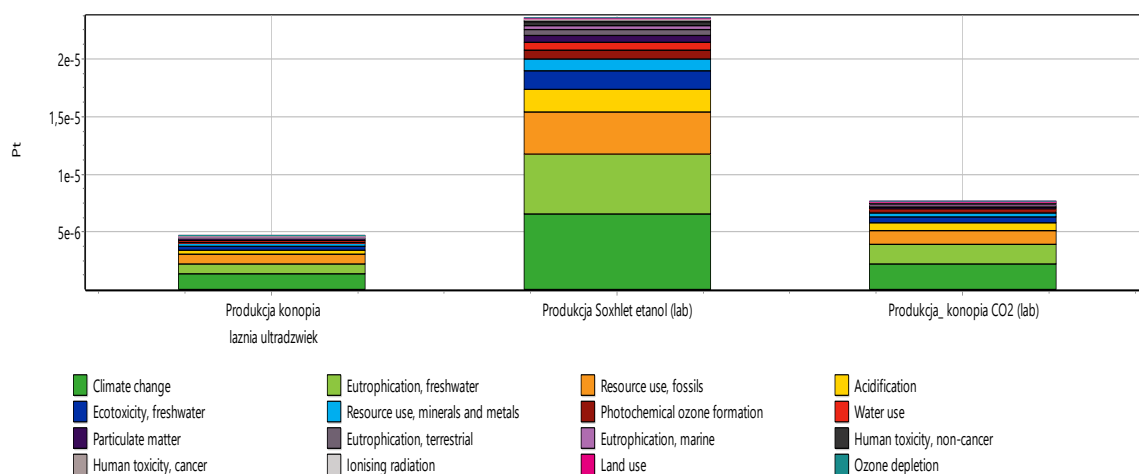
Na podstawie wyników uzyskanych w poprzedniej części analizy zaproponowano następujące zmiany dla scenariusza bazowego, w celu obniżenia wartości skumulowanego ekowskażnika:

1. Zmniejszenie zużycia etanolu – badania mikrobiologiczne przeprowadzone w części wcześniejszej pracy jasno wskazały, że formułacja oparta na ekstrakcie SC będzie wystarczająco skuteczna (redukcja >4 log) już przy zastosowaniu 30% stężenia alkoholu etylowego. Możliwe jest więc obniżenie zużycia etanolu w stosunku do wariantu bazowego, wykorzystującego ekstrakt SMF. Zmiana ta pozwoliła zmniejszyć wynik ekowskażnika etapu użytkowania z 0,000048 Pt na 0,0000288 Pt (spadek o 40%).
2. Wykorzystanie etanolu opartego na składnikach o lepszej efektywności środowiskowej (ang. life-cycle environmental performance) – w celu zaproponowania najbardziej korzystnego składnika przeanalizowano dostępną bazę Ecoinvent 3.8. Spośród dostępnych danych najbardziej efektywnym środowiskowo składnikiem do wytwarzania etanolu okazały się buraki cukrowe uprawiane w Szwajcarii. Zastąpienie globalnego miksu opartego głównie na trzcinie cukrowej uprawianej w krajach, w których stosuje się silnie obciążające środki ochrony roślin oraz nawozy pozwoliło na zmniejszenie ekowskażnika etapu użytkowania do wartości 0,00000758 (spadek o 73,68% w stosunku do wartości po wprowadzeniu pierwszej zmiany). Przeprowadzone analizy wskazały potencjalnie wysoką wrażliwość wyników LCA na pochodzenie surowca, z którego jest produkowany etanol. Jednakże ten aspekt wymagałby dalszej pogłębionej analizy

i porównania wyników dla różnych surowców oraz dla zbiorów danych pochodzących z różnych baz (np.: agri-footprint).

3. Zmniejszenie zużycia energii elektrycznej – spośród trzech metod otrzymywania ekstraktów konopnych najniższym zużyciem energii charakteryzowała się metoda ekstrakcji w łaźni ultradźwiękowej (wykres 6.4.). Zastosowanie scenariusza punktu pierwszego i drugiego w połączeniu ze wspomnianą metodą ekstrakcji pozwoliła na obniżenie wskaźnika produkcji z 0,000024 do 0,0000047 Pt (spadek o 80,5%). Należy jednak zwrócić w tym miejscu uwagę na fakt, iż w kontekście efektywności środowiskowej nie można rozpatrywać pojedynczej zmiennej w oderwaniu od pozostałych. W tym przypadku niezbędne okazało się przeliczenie energii elektrycznej w przeliczeniu na strumienie odniesienia, czyli ilości ekstraktu pozwalającego na dezynfekcję 1 m². Zabieg ten pozwolił na wskazanie metody ekstrakcji w nadkrytycznym CO₂ jako tej najbardziej efektywnej środowiskowo.

Wykres 6.4. Porównanie wartości ekowskaźnika single score



Method: EF 3.0 Method (adapted) V1.02 / EF 3.0 normalization and weighting set / Single score

źródło: SimaPro, opracowanie własne

4. Wykorzystanie energii o lepszej efektywności środowiskowej (ang. life-cycle environmental performance) – ponownie spośród wariantów dostępnych w bazie danych Ecoinvent 3.6 wybrano te o najniższym możliwym ekowskaźniku. Wariantem pozwalającym na najlepsze możliwe wyniki okazał się ten, w którym energia do produkcji ekstraktu pochodziła z elektrowni wodnych. Zastosowanie wszystkich czterech zmian pozwoliłoby na znaczne obniżenie wyniku do 0,00000021 Pt (spadek o 95,5%).

Wyniki skumulowanego pojedynczego ekowskaźnika (uszeregowane malejąco) dla cyklu życia każdego z rozpatrywanych scenariuszy zamieszczono w poniższej Tabeli 6.20.

Tabela 6.20. Wartości skumulowanego ekowskaźnika [Pt] wariantu bazowego oraz scenariuszy alternatywnych formulacji środka dezynfekującego.

Wariant rozpatrywanej formulacji/środek dezynfekujący	źródło energii elektrycznej	udział etanolu w formulacji	pochodzenie etanolu	źródło danych	Skumulowany pojedynczy ekowaskaźnik [Pt]
SMF	miks Polska	50%	miks światowy – trzcina cukrowa	laboratoryjne	7,16*10 ⁻⁵
CS	miks Polska			laboratoryjne	5,56*10 ⁻⁵
UMS	miks Polska			laboratoryjne	5,23*10 ⁻⁵
SMF	miks Polska			laboratoryjne	5,23*10 ⁻⁵
SMF	miks Polska			literaturowe	4,8*10 ⁻⁵
UMS	miks Polska			literaturowe	4,8*10 ⁻⁵
CS	miks Polska			literaturowe	4,8*10 ⁻⁵
CS	miks Polska	30%		laboratoryjne	3,64*10 ⁻⁵
UMS	miks Polska			laboratoryjne	3,35*10 ⁻⁵
SMF	miks Polska			literaturowe	2,88*10 ⁻⁵
SMF	miks Europa			literaturowe	2,88*10 ⁻⁵
SMF	fotowoltaika			literaturowe	2,88*10 ⁻⁵
SMF	wodna			literaturowe	2,88*10 ⁻⁵
UMS	miks Polska			literaturowe	2,88*10 ⁻⁵
UMS	miks Europa			literaturowe	2,88*10 ⁻⁵
UMS	wodna			literaturowe	2,88*10 ⁻⁵
UMS	fotowoltaika			literaturowe	2,88*10 ⁻⁵
CS	miks Polska			literaturowe	2,88*10 ⁻⁵
CS	miks Europa			literaturowe	2,88*10 ⁻⁵
CS	fotowoltaika			literaturowe	2,88*10 ⁻⁵
CS	wodna			literaturowe	2,88*10 ⁻⁵
SMF	fotowoltaika	Szwajcaria – burak cukrowy	laboratoryjne	1,53*10 ⁻⁵	
SMF	wodna		laboratoryjne	1,08*10 ⁻⁵	
UMS	fotowoltaika		laboratoryjne	9,96*10 ⁻⁶	
CS	fotowoltaika		laboratoryjne	9,42*10 ⁻⁶	
UMS	wodna		laboratoryjne	9,31*10 ⁻⁶	
CS	wodna		laboratoryjne	7,8*10 ⁻⁶	
SMF	fotowoltaika		literaturowe	7,66*10 ⁻⁶	
SMF	wodna		literaturowe	7,66*10 ⁻⁶	
UMS	wodna		literaturowe	7,65*10 ⁻⁶	
UMS	fotowoltaika		literaturowe	7,65*10 ⁻⁶	
CS	fotowoltaika		literaturowe	7,64*10 ⁻⁶	
CS	wodna		literaturowe	7,64*10 ⁻⁶	
podchloryn sodu				baza „ecoinvent”	5,61*10 ⁻⁶
PFA				literaturowe	5,03*10 ⁻⁶
podchloryn sodu				literaturowe	4,45*10 ⁻⁶
PAA				literaturowe	8,1*10 ⁻⁷

Źródło: opracowanie własne

Wprowadzenie zaproponowanych zmian pozwoliłoby na wyłonienie scenariusza alternatywnego, o najniższym możliwym wyniku ekowskaźnika. Najmniej obciążającą środowiskowo formułą spośród omawianych byłaby ta, wykorzystująca ekstrakty pozyskane w wyniku ekstrakcji w nadkrytycznym CO₂, przy udziale 30% etanolu pozyskanego z buraków cukrowych uprawianych w Szwajcarii, natomiast energia do produkcji pochodziłaby z elektrowni wodnych lub fotowoltaika. Zmiany te pozwalają na znaczną redukcję wyniku obciążenia środowiskowego (o blisko 90% w porównaniu do wariantu bazowego), do stopnia, w którym stworzony środek do dezynfekcji na bazie autorskiej formuły charakteryzowałby się zbliżonym wskaźnikiem obciążenia środowiskowego do najpowszechniej stosowanego podchlorynu sodu (odpowiednio $7,64 \cdot 10^{-6}$ vs $5,61 \cdot 10^{-6}$ Pt). Niemniej kwas nadoctowy nadal pozostaje znacznie mniej obciążający dla środowiska niż formuła z ekstraktem konopnym ($8,1 \cdot 10^{-7}$). Choć wyniki obciążenia środowiskowego autorskiej formuły są wysokie, to należy pamiętać, że większość danych pochodziła z produkcji laboratoryjnej, co mogło wpłynąć na zawyżenie wyników. Należy jednak zaznaczyć, że wysokie wyniki formuły z wykorzystaniem ekstraktów roślinnych spowodowane są też znacznie większymi, w stosunku do chloru, PAA czy PFA, stężeniami roboczymi, przy których środek dezynfekujący byłby skuteczny. W tym miejscu należy podkreślić, że analiza LCA nie obejmuje aspektów takich jak: uciążliwość pracy w warunkach stosowania wybranego środka do dezynfekcji, jego korozyjności dla maszyn i urządzeń czy wreszcie potencjału prowokowania mechanizmów oporności na związki chemiczne wśród drobnoustrojów. Pod tymi względami powszechnie stosowane środki dezynfekujące wypadają znacznie gorzej niż proponowane autorskie formuły. Pomimo oczekiwania znacznie niższych wyników obciążenia środowiskowego w porównaniu z handlowymi dezynfektantami, to podsumowując wszystkie wspomniane kwestie oraz wyniki uzyskanych badań skuteczności przeciwdrobnoustrojowej, uzasadnionym wydają się dalsze badania nad proponowanymi formułami, ich optymalizacja oraz próba opatentowania lub komercjalizacji.

Podsumowanie i wnioski

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było stworzenie formułacji skutecznego środka dezynfekującego, przeznaczonego dla przemysłu spożywczego, z wykorzystaniem ekstraktów roślinnych, mniej obciążającego środowisko naturalne niż tradycyjnie stosowane preparaty. Realizacja powyższego celu jest odpowiedzią na problem obecności mikroorganizmów patogennych w przestrzeni produkcyjnej zakładów przemysłu spożywczego, stanowiących poważne zagrożenie dla zdrowia i życia konsumentów. Jak dowiedziono w części teoretycznej, na podstawie raportów RASFF, problem ten jest wciąż aktualny. Widoczne jest to szczególnie na przykładzie Polski, wobec której skierowano ponad 1700 zgłoszeń dotyczących poważnego zakażenia żywności na przestrzeni ostatniej dekady, co stanowiło najwyższy wynik w Europie. Wynik ten może zaskakiwać, pomimo coraz bardziej szczegółowych kontroli, łatwiejszych metod wykrywania zagrożeń mikrobiologicznych na poziomie zakładów produkujących żywności czy coraz bardziej restrykcyjnych wymagań norm branżowych. Powodów można upatrywać w wielu obszarach, m. in.: nieskutecznym systemie zarządzania bezpieczeństwem mikrobiologicznym żywności, braku wiedzy z zakresu mikrobiologii, pojawianiu się nowych, opornych szczepów bakterii, czy wreszcie złym doborze środków myjących i dezynfekujących. Wybór odpowiednich środków do mycia i dezynfekcji powierzchni produkcyjnych odgrywa kluczową rolę w zapewnieniu czystości mikrobiologicznej. Pozwala to na skuteczne usuwanie zanieczyszczeń mikrobiologicznych, co przekłada się na bezpieczeństwo produktów. Jednak równie istotne są systemy zarządzania, które pełnią rolę wsparcia i umożliwiają kontrolę nad tymi procesami. Ich celem jest zapewnienie bezpieczeństwa mikrobiologicznego poprzez ścisłe monitorowanie i zarządzanie wszystkimi etapami czyszczenia oraz dezynfekcji. Badania prowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej skoncentrowane zostały na próbie stworzenia formułacji środka dezynfekującego, skutecznego wobec patogennych bakterii charakterystycznych dla przemysłu spożywczego, który dodatkowo wpisuje się w tak zwany trend „ekoprojektowania” nowych wyrobów.

W pierwszym etapie badań oceniono potencjał przeciwdrobnoustrojowy 14 handlowych olejków i ekstraktów CO₂ z roślin: oregano, kadzidłowca, konopi, lawendy, melisy, mięty i rozmarynu. Przeprowadzony „screening” pozwolił wskazać olejki i ekstrakty CO₂ z oregano i konopi, jako produkty o najsilniejszym działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Dla wymienionych produktów handlowych, wzrost każdego z 10 mikroorganizmów

wskaźnikowych był hamowany w co najmniej 90% w stężeniu 0,4%. Uzyskana na tym etapie wyniki traktowano jedynie jako sugestie co do wyboru roślin do dalszych badań, głównie ze względu na brak wiedzy dotyczącej zawartości substancji aktywnych w produktach handlowych. Do opracowania formulacji środka dezynfekującego niezbędna natomiast była możliwość precyzyjnego określenia stężenia poszczególnych składników wchodzących w skład preparatu. Niemniej, na podstawie badań pilotażowych oraz badań prowadzonych równoległe nad samodzielnie pozyskiwanymi ekstraktami z roślin gojnika, do dalszych badań wytypowano konopie, oregano oraz gojnik.

Z wymienionych roślin pozyskano ekstrakty czterema różnymi metodami: ekstrakcją Soxhleta, wspomaganą ultradźwiękami, w nadkrytycznym CO₂ i hydrodestylacją. Pozyskano w ten sposób 27 ekstraktów, które poddano następnie analizie zawartości związków polifenolowych metodą Folina-Ciocalteu. Największą całkowitą zawartość związków polifenolowych odnotowano dla ekstraktów z oregano i konopi odm. *Santhica* pozyskanych metodą Soxhleta z metanolem (odpowiednio 3,83 i 3,63 mg GAE/1 g s.m). Wyniki uzyskane w przypadku ekstraktów pozyskanych metodą ekstrakcji w nadkrytycznym CO₂, z tych samych roślin, były istotnie niższe, choć warto nadmienić, że były to nadal jedne z najwyższych i wynosiły kolejno: 1,62 i 3,16 mg GAE/1 g s.m.

W kolejnym kroku, wszystkie pozyskane laboratoryjnie ekstrakty zostały poddane ocenie w zakresie właściwości przeciwdrobnoustrojowych. W przypadku samodzielnie uzyskanych ekstraktów roślinnych znane były ich dokładne stężenia masowe, co pozwoliło na precyzyjne określenie wartości minimalnych stężeń hamujących wzrost bakterii (MIC). Wzrost każdej z 10 wybranych do oznaczeń bakterii: *B. subtilis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *M. luteus*, *C. perfringens*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. jejuni* i *S. Enteritidis*, był hamowany przy zastosowaniu ekstraktów roślinnych, jednak stopień zahamowania w poszczególnych stężeniach był zmienny. Wartości MIC znacząco różniły się między sobą w zależności od pochodzenia ekstraktu, metody ekstrakcji i wariantu rozpuszczalnika. Istotna była też przynależność bakterii do grupy Gram-dodatnich lub Gram-ujemnych, przy czym zdecydowanie mniej wrażliwe na działanie ekstraktów roślinnych były te ostatnie. Najniższą wartość MIC wobec wszystkich bakterii, świadczącą o najsilniejszym działaniu przeciwdrobnoustrojowym, na poziomie 0,25 mg/ml, wyznaczono dla ekstraktu CO₂ z konopi odm. *Satnhica*. W przypadku pozostałych ekstraktów wartości te były od 8 do 64 razy wyższe.

Dla 15 ekstraktów, dla których oznaczono wartość MIC w zakresie od 0,25 do 16 mg/ml przeprowadzono eksperyment mający na celu określenie właściwości antybiofilmowych. Zbadano potencjał hamowania biofilmu bakterii *L. monocytogenes*, *S. aureus* oraz *P. aeruginosa*, na etapie jego formowania, a także zdolność do usuwania struktur dojrzałego biofilmu. Wyniki eksperymentu wykazały, że nie wszystkie badane ekstrakty charakteryzowały się właściwościami antybiofilmowymi. Wskazano 6 ekstraktów, które skutecznie hamowały wzrost biofilmu oraz 3, które usuwały dojrzały biofilm każdej z bakterii na poziomie powyżej 50% w stężeniu 1*MIC. Na podstawie badań właściwości przeciwdrobnoustrojowych i antybiofilmowych, do stworzenia formułacji skutecznego środka dezynfekującego wybrano ekstrakty: CO₂ z konopi odm. *Santhica*, Soxhleta z konopi odm. *Futura* oraz metanolowy z konopi odm. *Futura* po ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami. Choć wyniki usuwania dojrzałego biofilmu wskazywały na niepełne usunięcie biofilmu, szczególnie bakterii Gram-ujemnych z gatunku *P. aeruginosa*, to należy jednak podkreślić, że w procesie usuwania biofilmu bakteryjnego duże znaczenie odgrywają procesy mycia oraz mechaniczne metody usuwania zanieczyszczeń. To one odpowiedzialne są za wstępne wzruszenie struktury biofilmu tak, aby środki dezynfekujące używane na kolejnym etapie były jak najskuteczniejsze. Dlatego właśnie w badaniach przeprowadzonych w niniejszej pracy, większe znaczenie miała zdolność hamowania wzrostu biofilmu niż zdolność jego usuwania. Podsumowując, na tym etapie badań możliwe było **pozytywne** zweryfikowanie pierwszej z hipotez (H1):

H1: Ekstrakty roślinne charakteryzują się właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi i antybiofilmowymi w stosunku do mikroorganizmów stanowiących największe zagrożenie w przemyśle spożywczym

W kolejnym etapie pracy przygotowano warianty formułacji preparatu dezynfekującego z wykorzystaniem wyżej wspomnianych trzech ekstraktów w różnych wariantach stężeń (0,5*MIC, 1*MIC i 2*MIC) oraz zawartości alkoholu etylowego (30%, 40% i 50%). Stworzone formułacje poddane zostały ocenie skuteczności według normy PN-EN 13697+A1:2015. Badanie zostało przeprowadzone symulując zarówno warunki czyste jak i brudne, mające odzwierciedlić jak najlepiej rzeczywiste środowisko produkcyjne. Uzyskane wyniki pozwoliły na wskazanie wariantów, które mogą zostać uznane za skuteczne w usuwaniu zagrożeń mikrobiologicznych, typowych dla przemysłu spożywczego. Najwyższe wartości redukcji

wzrostu mikroorganizmów w stężeniu 1*MIC i przy udziale 30% etanolu uzyskano przy zastosowaniu w formulacjach ekstraktów CO₂ z konopi odm. *Santhica* (>4,68 log w warunkach brudnych i >4,98 log w warunkach czystych, wobec wszystkich bakterii wskaźnikowych). W przypadku formulacji z ekstraktami UAE metanолоwymi z konopi odm. *Santhica* założoną skuteczność redukcji (>4 log) wyznaczono przy stężeniu 2*MIC. W świetle uzyskanych wyników możliwe było pozytywne zweryfikowanie hipotezy drugiej (H2), ponieważ wg. normy, za skuteczne uznaje się te środki dezynfekujące, w przypadku których redukcja jednostek logarytmicznych wobec wskazanych bakterii wskaźnikowych (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* i *E. faecalis*) jest wyższa niż 4.

H2: Formułacje środków dezynfekujących zawierające ekstrakty roślinne jako główny czynnik przeciwdrobnoustrojowy są skuteczne w dezynfekcji powierzchni abiotycznych i mogą zostać uznane za skuteczny środek dezynfekujący zgodnie z normą PN-EN 13697+A1:2015

Ostatnim etapem pracy badawczej była ocena cyklu życia stworzonych formułacji dezynfekujących, wykorzystujących ekstrakty roślinne. W tym celu, w pierwszej kolejności wykonano analizę cyklu życia wariantu bazowego (Soxhlet konopie odm. Futura, 50% etanolu, 2*MIC). Całkowite potencjalne oddziaływanie na środowisko (single score) związane z dezynfekcją 1 m² powierzchni w wariantie bazowym wyniosło 7,16*10⁻⁵ Pt. W kolejnym kroku zidentyfikowano środowiskowe punkty krytyczne związane zarówno z etapem produkcji jak i użytkowania potencjalnego preparatu dezynfekującego w wariantie bazowym. Dzięki możliwości dotarcia do tak zwanej kołyski każdego z procesów, możliwe było wskazanie, iż głównymi źródłami obciążenia środowiskowego w przypadku rozpatrywanego preparatu byłoby zużycie energii elektrycznej potrzebnej do produkcji oraz etanol wykorzystywany jako rozpuszczalnik. Dwa wspomniane procesy odpowiadały za większą część wyniku single score. Dalej przeprowadzono kalkulacje dla scenariuszy alternatywnych, starając się wybrać efektywniejsze środowiskowo źródła energii elektrycznej, a także etanolu. Stworzono idealny wariant formułacji dezynfekującej pod względem oddziaływania na środowisko i skuteczności działania. Wariant takiej formułacji wykorzystywałby ekstrakty pozyskane w wyniku ekstrakcji w nadkrytycznym CO₂, rozpuszczalnik stanowiłby etanol (w objętości 30%) pozyskany z buraków cukrowych uprawianych w Szwajcarii, natomiast energia do produkcji pochodziłaby z elektrowni

wodnych lub fotowoltaicznych. Zaproponowane zmiany pozwoliły na obniżenie wyniku single score z $7,16 \cdot 10^{-5}$ do $7,64 \cdot 10^{-6}$. Analiza LCA scenariusza bazowego, identyfikacja znaczących kwestii środowiskowych i wreszcie kalkulacja scenariuszy alternatywnych pozwoliła na pozytywne zweryfikowanie trzeciej hipotezy (H3).

H3: Skuteczna formuła dezynfekująca wykorzystująca ekstrakty CO₂ charakteryzuje się najmniejszym obciążeniem środowiskowym spośród stworzonych wariantów

Dopełnieniem analizy LCA było porównanie wyników single score wariantu bazowego, scenariuszy alternatywnych i powszechnie stosowanych środków dezynfekujących takich jak: podchloryn sodu, PAA i PFA. Wyniki analizy porównawczej wskazały, że nawet w idealnym wariantcie alternatywnym tworzone formuły były bardziej obciążające środowisko naturalne niż produkty dostępne w handlu. Oczywiście wpływ na to może mieć wiele czynników (np.: skala laboratoryjna produkcji ekstraktów czy nieoptymalny proces ekstrakcji), przez które wyliczenia należy traktować szacunkowo, niemniej hipoteza czwarta (H4) została zweryfikowana negatywnie.

H4: Opracowane preparaty dezynfekujące charakteryzują się mniejszym wskaźnikiem obciążenia środowiskowego liczonego z wykorzystaniem metody LCA, niż popularne dezynfektanty dostępne w handlu (podchloryn sodu, PCA i PFA).

Sytuacja ta pozwala na sformułowanie nieoczywistych wniosków. Aby uzyskać prawdziwie efektywne środowiskowo rozwiązanie problemu dezynfekcji, niezbędne jest wprowadzenie rozwiązań w duchu tak zwanego zrównoważonego rozwoju na wielu płaszczyznach, w tym np.: w rolnictwie (produkcja etanolu) i energetyce (produkcja energii elektrycznej). Rozpatrywanie jednej składowej systemu, przy pozostałych nie pozwala na osiągnięcie celu jakim jest ekoprojektowanie. Należy jednak zwrócić uwagę, że wyniki idealnego scenariusza były zbliżone do wartości single score podchlorynu sodu, co można uznać, mimo wszystko, za zadowalający wynik. Warto wspomnieć, że ekstrakty roślinne mają wiele zalet pomijanych w analizie LCA. Są to przede wszystkim: nieprovokowanie mechanizmów oporności, brak korozyjności wobec maszyn i urządzeń, nietoksyczność dla ssaków, a także szybka degradacja w środowisku wodnym. Łącząc wszystkie wspomniane aspekty należy uznać, że formuła preparatu dezynfekującego zawierająca ekstrakt CO₂ z konopni (odm. *Santhica*) i 30% etanolu spełnia postawiony w pracy cel i może zostać uznana za obiecującą alternatywę dla

chemicznych dezynfektantów wykorzystywanych w przemyśle spożywczym. Przedstawione w pracy rozwiązanie wykazuje potencjał w zakresie wsparcia zarządzania bezpieczeństwem mikrobiologicznym żywności, przy jednoczesnym zachowaniu dbałości o istotne kwestie społeczne takie jak szkodliwość dla środowiska naturalnego i toksyczność dla ludzi.

Wnioski:

- 1. Skuteczność przeciwdrobnoustrojowa:** Badania potwierdziły, że ekstrakty roślinne, zwłaszcza z roślin konopi i oregano, wykazują silne działanie przeciwbakteryjne. Najsilniejszym działaniem hamującym wzrost bakterii wykazał się ekstrakt CO₂ z konopi odm. *Santhica*, co stanowi obiecującą perspektywę wykorzystania go w formułacjach dezynfekujących dla przemysłu spożywczego.
- 2. Właściwości antybiofilmowe:** Opracowane preparaty nie tylko hamowały wzrost bakterii, ale także wykazywały zdolność do ograniczania tworzenia i usuwania biofilmu. To istotne, biorąc pod uwagę, że biofilm może być szczególnie trudny do usunięcia i stanowi poważne zagrożenie dla higieny w przemyśle spożywczym, a tym samym dla zdrowia publicznego.
- 3. Zrównoważone podejście do produkcji:** Analiza cyklu życia preparatów dezynfekujących wykorzystujących ekstrakty roślinne pozwoliła zidentyfikować potencjalne punkty krytyczne i wprowadzić ulepszenia, takie jak zmniejszenie zużycia energii elektrycznej, wskazanie jej efektywniejszych źródeł i zastąpienie tradycyjnego źródła pochodzenia etanolu bardziej ekologicznymi. To pokazuje, że podejście ekoprojektowania jest kluczowe dla minimalizacji wpływu na środowisko nowopowstających produktów.
- 4. Wyważenie skuteczności i ekotoksyczności mierzonej w ramach podejścia LCA:** Chociaż preparaty dezynfekujące oparte na ekstraktach roślinnych mogą być bardziej obciążające dla środowiska niż tradycyjne środki chemiczne, istnieje potrzeba uwzględnienia wszystkich aspektów, takich jak toksyczność dla ludzi i ssaków, prowokowanie bakterii do wytwarzania mechanizmów oporności, niszczący wpływ na maszyny i urządzenia w przestrzeni produkcyjnej i wpływ na ekosystem. Interdyscyplinarne podejście i rozpatrywanie tych czynników razem jest kluczowe dla osiągnięcia równowagi między skutecznością dezynfekcji, zdrowiem publicznym, a minimalizacją wpływu na środowisko.

W rezultacie, zrealizowanie badania sugerują, że preparaty dezynfekujące oparte na ekstraktach roślinnych, zwłaszcza te zawierające ekstrakt konopny CO₂, mogą być obiecującą alternatywą dla tradycyjnych środków dezynfekcyjnych w przemyśle spożywczym, jeśli zostaną odpowiednio zoptymalizowane pod kątem skuteczności i oddziaływania na środowisko naturalne.

Ograniczenia w zakresie możliwości stosowania preparatów dezynfekujących opartych na ekstraktach roślinnych:

- 1. Skuteczność:** Pomimo obiecujących wyników, skuteczność preparatów dezynfekcyjnych opartych na ekstraktach roślinnych może być różna w zależności od rodzaju i gatunku mikroorganizmów i warunków środowiskowych uprawy roślin. Konieczne jest dalsze badanie i doskonalenie formulacji, aby zapewnić ich skuteczność w różnych warunkach.
- 2. Stabilność i trwałość:** Ekstrakty roślinne mogą być podatne na degradację pod wpływem czynników środowiskowych, co może wpływać na ich stabilność i trwałość w preparacie dezynfekującym. Konieczne jest badanie sposobów zapewnienia długotrwałości preparatów dezynfekcyjnych opartych na ekstraktach roślinnych, aby utrzymać ich skuteczność w czasie.
- 3. Akceptacja i regulacje prawne:** Nowe preparaty dezynfekcyjne będą musiały przejść proces akceptacji i regulacji, co może wymagać czasu i środków finansowych. Konieczne jest uzyskanie aprobaty organów regulacyjnych oraz zaufania ze strony klientów i użytkowników.
- 4. Zasoby surowcowe:** Produkcja preparatów dezynfekcyjnych opartych na ekstraktach roślinnych może wymagać znacznych zasobów surowcowych, zwłaszcza jeśli chodzi o uzyskanie ekstraktów wysokiej jakości w wystarczającej ilości. Konieczne jest badanie alternatywnych źródeł surowców oraz metod optymalizacji metod ekstrakcji.

Dalsze kierunki rozwoju:

- 1. Badania nad synergizmem składników:** Badania nad synergizmem składników preparatów dezynfekcyjnych mogą prowadzić do identyfikacji kombinacji ekstraktów roślinnych i innych substancji, które wzmacniają ich działanie przeciwdrobnoustrojowe i antybiofilmowe.
- 2. Innowacje technologiczne:** Kontynuacja badań z wykorzystaniem innowacyjnych metod ekstrakcji substancji roślinnych może prowadzić do usprawnienia procesu pozyskiwania ekstraktów oraz zwiększenia efektywności ekstrakcji.
- 3. Badania nad bezpieczeństwem i toksycznością:** Konieczne są dalsze badania nad bezpieczeństwem i toksycznością preparatów dezynfekcyjnych opartych na ekstraktach roślinnych, aby zapewnić, że są one bezpieczne dla użytkowników, konsumentów i środowiska.
- 4. Edukacja i świadomość:** Wzrost świadomości na temat korzyści i potencjalnych zastosowań preparatów dezynfekcyjnych opartych na ekstraktach roślinnych może przyczynić się do ich szerszego stosowania w różnych sektorach, w tym w przemyśle spożywczym.

Podsumowując, dalszy rozwój preparatów dezynfekcyjnych opartych na ekstraktach roślinnych wymaga badania i rozwiązywania istniejących ograniczeń oraz kontynuacji innowacyjnych badań nad synergizmem składników, technologiami produkcji i bezpieczeństwem użytkowania. Wprowadzenie tych preparatów do praktyki wymaga również edukacji i świadomości wśród użytkowników oraz akceptacji ze strony regulacyjnych instytucji.

Bibliografia

- Abdullah, Asghar, A., Algburi, A., Huang, Q., Ahmad, T., Zhong, H., Javed, H. U., Ermakov, A. M., & Chikindas, M. L. (2021). Anti-biofilm Potential of *Elletaria cardamomum* Essential Oil Against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium JSG 1748. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.620227>
- Abouzeed, Y. M., Zgheel, F., Elfahem, A. A., Almagarhe, M. S., Dhawi, A., Elbaz, A., Hiblu, M. A., Kammon, A., & Ahmed, M. O. (2018). Identification of phenolic compounds, antibacterial and antioxidant activities of raisin extracts. *Open Veterinary Journal*, 8(4), 479–484. <https://doi.org/10.4314/ovj.v8i4.20>
- Agún, S., Fernández, L., González-Menéndez, E., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2018). Study of the interactions between bacteriophage phiPLA-RODI and four chemical disinfectants for the elimination of *Staphylococcus aureus* contamination. *Viruses*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/v10030103>
- Akbas, M. Y., Cag, S. (2016). Use of organic acids for prevention and removal of *Bacillus subtilis* biofilms on food contact surfaces. *Food science and technology international = Ciencia y tecnologia de los alimentos internacional*, 22(7), 587–597. <https://doi.org/10.1177/1082013216633545>
- Alert and Cooperation Network. (2022). 2022 Annual Report. Pobrano z: https://food.ec.europa.eu/document/download/499ffcf1-6c99-43ec-8905-5ff3e812eeb2_en?filename=acn_annual-report_2022.pdf
- Alert and Cooperation Network. *Baza danych RASFF: Zgłoszenia o zanieczyszczeniach mikrobiologicznych w żywności, lata 2010-2022*. Pobrano z: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search>
- Alizadeh Behbahani, B., Shahidi, F. (2019). *Melissa officinalis* essential oil: Chemical compositions, antioxidant potential, total phenolic content and antimicrobial activity. *Nutrition and Food Sciences Research*, 6(1), 17-25.
- Al-Maqtari, Q. A., Al-Ansi, W., Mahdi, A. A., Al-Gheethi, A. A. S., Mushtaq, B. S., Al-Adeeb, A., Wei, M., Yao, W. (2021). Supercritical fluid extraction of four aromatic herbs and assessment of the volatile compositions, bioactive compounds, antibacterial, and anti-biofilm activity. *Environmental science and pollution research international*, 28(20), 25479–25492. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12346-6>
- Angarano, V., Akkermans, S., Smet, C., Chieffi, A., & van Impe, J. F. M. (2020). The potential of violet, blue, green and red light for the inactivation of *P. fluorescens* as planktonic cells, individual cells on a surface and biofilms. *Food and Bioproducts Processing*, 124, 184–195. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.07.019>

- Antunes, P., Mourão, J., Campos, J., Peixe, L. (2016). Salmonellosis: The role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 110–121. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.004>
- Bajera, T.; Silha, D.; Ventura, K.; Bajerov, P. Composition and antimicrobial activity of the essential oil, distilled aromatic water and herbal infusion from *Epilobium parviflorum* Schreb. *Ind. Crops Prod.*, 100, 95–105.
- Baranowska, K., A. Rodziejewicz. (2008). “Molekularne Interakcje w Biofilmach Bakteryjnych.” *Kosmos*, 57(1–2), 29–38.
- Bazargani, M.M., Rohloff, J. (2016). Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*, 61, 156-164.
- Ben Abdallah, F., Lagha, R., Gaber, A. (2020). Biofilm Inhibition and Eradication Properties of Medicinal Plant Essential Oils against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 13(11), 369. <https://doi.org/10.3390/ph13110369>
- Ben Farhat, M.; Landoulsi, A.; Chaouch-Hamada, R.; Sotomayor, J.A.; Jordán, M.J. Profiling of essential oils and polyphenolics of *Salvia argentea* and evaluation of its by-products antioxidant activity. *Ind. Crop. Prod.*, 47, 106–112.
- Biuletyn Informacji Publicznej Rzecznika Praw Obywatelskich. (2022). RPO - Kontrola Żywności. Pobrano z: <https://bip.brpo.gov.pl/pl/content/rpo-kontrola-zywnosci-problemy-mz>
- Bodie, A. R., Dittoe, D. K., Feye, K. M., Knueven, C. J., & Ricke, S. C. (2019). Application of an Alternative Inorganic Acid Antimicrobial for Controlling *Listeria monocytogenes* in Frankfurters. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3(May), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00034>
- Booth, A., Sutton, A., & Papaioannou, D. (2016). Taking a systematic approach to your literature review. In *Systematic approaches to a successful literature review* (Vol. 2n).
- Bosch, A., Gkogka, E., Le Guyader, F. S., Loisy-Hamon, F., Lee, A., Van Lieshout, L., Phister, T. (2018). Foodborne viruses: Detection, risk assessment, and control options in food processing. *International Journal of Food Microbiology*, 285, 110-128.
- Breza-Boruta, B., Szala, B., Kroplewska, M. (2016). Powietrze na liniach produkcyjnych zakładu mięsnego jako źródło zanieczyszczenia mikrobiologicznego. DOI: 10.15611/pn.2016.461.04.
- Bridle, Irew, Elizabeth Nosworthy, Mark Polinski, Barbara Nowak. (2011). “Evidence of an Antimicrobial-Immunomodulatory Role of Atlantic Salmon Cathelicidins during Infection with *Yersinia Ruckeri*.” *PLoS ONE*, 6(8).

- Brooks, J. D., Flint, S. H. (2008). Biofilms in the food industry: Problems and potential solutions. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(12), 2163–2176. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01839.x>
- Camargo, A. C., Woodward, J. J., Call, D. R., Nero, L. A. (2017). *Listeria monocytogenes* in Food-Processing Facilities, Food Contamination, and Human Listeriosis: The Brazilian Scenario. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(11), 623–636. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2274>
- Carrascosa, C., Raheem, D., Ramos, F., Saraiva, A., Raposo, A. (2021). Microbial Biofilms in the Food Industry-A Comprehensive Review. *International journal of environmental research and public health*, 18(4), 2014. <https://doi.org/10.3390/ijerph18042014>.
- Carter, M. Q., Louie, J. W., Feng, D., Zhong, W., Brandl, M. T. (2016). Curli fimbriae are conditionally required in *Escherichia coli* O157 : H7 for initial attachment and biofilm formation. 57. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.01.006>
- Castillo-Herrera, G. A., GarcíA-Fajardo, J. A., & Estarrón-Espinosa, M. (2007). Extraction method that enriches phenolic content in oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.) essential oil. *Journal of Food Process Engineering*, 30(6). <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2007.00134.x>
- Chagnot, C., Caccia, N., Loukiadis, E., Ganet, S., Durand, A., Bertin, Y., Talon, R., Astruc, T., Desvaux, M. (2014). International Journal of Food Microbiology Colonization of the meat extracellular matrix proteins by O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.016>
- Chavant, P., Gaillard-Martinie, B., Talon, R., Hébraud, M., Bernardi, T. (2007). A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *Journal of microbiological methods*, 68(3), 605–612. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.11.010>
- Chen, H. M., Wang, Y., Su, L. H., Chiu, C. H. (2013). Nontyphoid *Salmonella* infection: Microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. *Pediatrics and Neonatology*, 54(3), 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2013.01.010>.
- Choi, J. M., Camfield, E., Bowman, A., Rajan, K., Labbé, N., Gwinn, K. D., Ownley, B. H., Moustaid-Moussa, N., & D'Souza, D. H. (2021). Value-added switchgrass extractives for reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium populations on Formica coupons. *Food Microbiology*, 95, 103674. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103674>
- Chun, S. S., Vattem, D. A., Lin, Y. T., Shetty, K. (2005). Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry*, 40(2), 809-816.
- Codex Alimentarius Commission. General Standard for Food Additives (CODEX STAN 192-1995).
Pobrano z: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/list-standards/en/>

- Cuggino, Sofia G., (2020). "Modelling the Combined Effect of Chlorine, Benzyl Isothiocyanate, Exposure Time and Cut Size on the Reduction of *Salmonella* in Fresh-Cut Lettuce during Washing Process." *Food Microbiology*, 86, 103346. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103346>
- Dambolena, J. S., Zunino, M. P., Lucini, E. I., Olmedo, R., Banchio, E., Bima, P. J., Zygodlo, J. A. (2010). Total phenolic content, radical scavenging properties, and essential oil composition of *Origanum* species from different populations. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(2), 1115-1120
- de Oliveira, D. C. V., Fernandes Júnior, A., Kaneno, R., Silva, M. G., Araújo Júnior, J. P., Silva, N. C. C., & Rall, V. L. M. (2014). Ability of salmonella spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(6), 478–483. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1710>
- de Rapper, S., Kamatou, G., Viljoen, A., & van Vuuren, S. (2013). The in vitro antimicrobial activity of *Lavandula angustifolia* essential oil in combination with other aroma-therapeutic oils. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/852049>
- Dhowlaghar, N., de Abrew Abeyesundara, P., Nannapaneni, R., Schilling, M. W., Chang, S., Cheng, W. H., & Sharma, C. S. (2018). Growth and biofilm formation by *Listeria monocytogenes* in catfish mucus extract on four food contact surfaces at 22 and 108c and their reduction by commercial disinfectants. *Journal of Food Protection*, 81(1), 59–67. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-103>
- Di Onofrio, V., Gesuele, R., Maione, A., Liguori, G., Liguori, R., Guida, M., Nigro, R., Galdiero, E. (2019). Prevention of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation on Soft Contact Lenses by *Allium sativum* Fermented Extract (BGE) and Cannabinol Oil Extract (CBD). *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 8(4), 258. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040258>
- Ding, T., (2016). "Disinfection Efficacy and Mechanism of Slightly Acidic Electrolyzed Water on *Staphylococcus Aureus* in Pure Culture." *Food Control*, 60, 505–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.08.037>
- Dittoe, D. K., Atchley, J. A., Feye, K. M., Lee, J. A., Knueven, C. J., & Ricke, S. C. (2019). The efficacy of sodium bisulfate salt (SBS) alone and combined with peracetic acid (PAA) as an antimicrobial on whole chicken drumsticks artificially inoculated with *Salmonella enteritidis*. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(JAN), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00006>
- Donaghy, J. A., Jagadeesan, B., Goodburn, K., Grunwald, L., Jensen, O. N., Jespers, A., Kanagachandran, K., Lafforgue, H., Seefelder, W., & Quentin, M. C. (2019). Relationship of sanitizers, disinfectants, and cleaning agents with antimicrobial resistance. *Journal of Food Protection*, 82(5), 889–902. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-373>

- Džamić, A. M., Nikolić, B. J., Giweli, A. A., Mitić-Ćulafić, D. S., Soković, M. D., Ristić, M. S., Knežević-Vukčević, J. B., & Marin, P. D. (2015). Libyan *Thymus capitatus* essential oil: Antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and colon pathogen adhesion-inhibition properties. *Journal of Applied Microbiology*, 119(2). <https://doi.org/10.1111/jam.12864>
- EFRWP. (2023). Rynek Żywności w Polsce w 2022 roku. Pobrano z: <https://efrwp.pl/publikacje/rynek-zywnosci-w-polsce-w-2022-roku/>
- European Commission, Joint Research Centre. (n.d.). EF Transition. Retrieved from <https://eplca.jrc.ec.europa.eu/EFtransition.html>.
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 16(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>
- Fagerlund, A., Moretro, T., Heir, E., Briandet, R., Langsrud, S., Møretrø, T., Heir, E., Briandet, R., & Langsruda, S. (2017). Cleaning and Disinfection of Biofilms Composed of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(17), 1–21.
- Falcó, I., Verdeguer, M., Aznar, R., Sánchez, G., & Randazzo, W. (2019). Sanitizing food contact surfaces by the use of essential oils. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 51(2017), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.02.013>
- Farber, J. M., Zwietering, M., Wiedmann, M., Schaffner, D., Hedberg, C. W., Harrison, M. A., Hartnett, E., Chapman, B., Donnelly, C. W., Goodburn, K. E., & Gummalla, S. (2021). Alternative approaches to the risk management of *Listeria monocytogenes* in low risk foods. *Food Control*, 123, 107601. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107601>
- Fathordoobady, F., Singh, A., Kitts, D. D., & Pratap Singh, A. (2019). Hemp (*Cannabis Sativa* L.) Extract: Anti-Microbial Properties, Methods of Extraction, and Potential Oral Delivery. *Food Reviews International* (Vol. 35, Issue 7). <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1600539>
- Fernandes, S., Gomes, I. B., & Simões, M. (2020). Antimicrobial activity of glycolic acid and glyoxal against *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens*. *Food Research International*, 136, 109346. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109346>
- Filter, M., Sundermann, E. M., Mesa-Varona, O., Buschhardt, T., Lopez de Abechuco, E., & Georgiadis, M. (2021). Minimum Information Required to Annotate Food Safety Risk Assessment Models (MIRARAM). *Food Research International*, 139(April 2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109952>
- Fukuzaki, S. (2006). Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Science* (Vol. 11, Issue 4). <https://doi.org/10.4265/bio.11.147>

- Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., Lombó, F. (2018). Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00898>
- Green, A., Popovi, V., Pierscianowski, J., Biancaniello, M., Warriner, K., & Koutchma, T. (2018). Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria* and *Salmonella* by single and multiple wavelength ultraviolet-light emitting diodes. 47(November 2017), 353–361. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.03.019>
- Gülcan, Z., Saltan, N., İşcan, G., Kürkçüoğlu, M., & Köse, Y. B. (2022). Antimicrobial and antioxidant activities of *Sideritis lanata* L. extracts. *European Journal of Life Sciences*, 1(2). <https://doi.org/10.55971/ejls.1181461>
- Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Fernández, L., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2017). Applicability of commercial phage-based products against *Listeria monocytogenes* for improvement of food safety in Spanish dry-cured ham and food contact surfaces. *Food Control*, 73, 1474–1482. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.007>
- Gwiazdowski, R., Gwiazdowska, D., Marchwińska, K., Juś, K., Szutowska, J., Bednarek-Bartsch, A., Danielewicz, B. (2018). Fungistatic activity of essential oils towards selected oilseed rape pathogens. *Progress in Plant Protection*, 58(4), 300-305.
- Haff, R. P., & Toyofuku, N. (2008). X-ray detection of defects and contaminants in the food industry. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety* (Vol. 2, Issue 4). <https://doi.org/10.1007/s11694-008-9059-8>
- Han, Q., Song, X., Zhang, Z., Fu, J., Wang, X., Malakar, P. K., Liu, H., Pan, Y., & Zhao, Y. (2017). Removal of foodborne pathogen biofilms by acidic electrolyzed water. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00988>
- Hendry, E. R., T. Worthington, B. R. Conway, P. A. Lambert. (2009). Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(6), 1219–1225. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp362>
- Hossain, M. B., Brunton, N. P., Patras, A., Tiwari, B., O'donnell, C. P., Martin-Diana, A. B., Barry-Ryan, C. (2012). Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. *Ultrasonics sonochemistry*, 19(3), 582-590.
- Hricova, D., Stephan, R., & Zweifel, C. (2008). Electrolyzed water and its application in the food industry. *Journal of Food Protection*, 71(9), 1934–1947. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.9.1934>
- Hussain, Mohammad Shakhawat, Charles Nkufi Tango, Deog Hwan Oh. (2019). Inactivation Kinetics of Slightly Acidic Electrolyzed Water Combined with Benzalkonium Chloride and Mild

- Heat Treatment on Vegetative Cells, Spores, and Biofilms of *Bacillus cereus*. *Food Research International*, 116, 157–67. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.003>
- Iñiguez-Moreno, M., Avila-Novoa, M. G., Iñiguez-Moreno, E., Guerrero-Medina, P. J., & Gutiérrez-Lomelí, M. (2017). Antimicrobial activity of disinfectants commonly used in the food industry in Mexico. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 10(2010), 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.05.013>
- International Organization for Standardization. (2006). ISO 14040:2006 Environmental management - Life cycle assessment - Principles and framework (p. 4.2).
- International Organization for Standardization. (2018). ISO 22000:2018 Food safety management systems -- Requirements for any organization in the food chain.
- Ishaq, A., Syed, Q. A., Khan, M. I., & Zia, M. A. (2019). Characterising and optimising antioxidant and antimicrobial properties of clove extracts against food-borne pathogenic bacteria. *International Food Research Journal*, 26(4), 1165–1172.
- ISO 14502-1:2005, Oznaczanie substancji charakterystycznych dla zielonej i czarnej herbaty. Część 1: Zawartość wszystkich polifenoli w herbacie. Metoda kolorymetryczna z zastosowaniem odczynnika Folina-Ciocalteu.
- Jagannathan, B. V., Kitchens, S., Vijayakumar, P. P., Price, S., & Morgan, M. (2020). Potential for bacteriophage cocktail to complement commercial sanitizer use on produce against escherichia coli o157:H7. *Microorganisms*, 8(9), 1–13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091316>
- Jalali, S., & Wohlin, C. (2012). Systematic literature studies: Database searches vs. backward snowballing. *International Symposium on Empirical Software Engineering and Measurement*, 29–38. <https://doi.org/10.1145/2372251.2372257>
- Jeon, H. R., Kwon, M. J., & Yoon, K. S. (2018). Control of *Listeria innocua* biofilms on food contact surfaces with slightly acidic electrolyzed water and the risk of biofilm cells transfer to duck meat. *Journal of Food Protection*, 81(4), 582–592. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-373>
- Jianu, C., Moleriu, R., Stoin, D., Cocan, I., Bujancă, G., Pop, G., Lukinich-Gruia, A. T., Muntean, D., Rusu, L. C., & Horhat, D. I. (2021). Antioxidant and antibacterial activity of *Nepeta × faassenii bergmans ex stearn* essential oil. *Applied Sciences* (Switzerland), 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.3390/app11010442>.
- Jiménez-Pichardo, R., Regalado, C., Castaño-Tostado, E., Meas-Vong, Y., Santos-Cruz, J., & García-Almendárez, B. E. (2016). Evaluation of electrolyzed water as cleaning and disinfection agent on stainless steel as a model surface in the dairy industry. *Food Control*, 60, 320–328. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.08.011>

- Jokić, S., Jerković, I., Pavić, V., Aladić, K., Molnar, M., Kovač, M. J., Vladimir-Knežević, S. (2022). Terpenes and cannabinoids in supercritical CO₂ extracts of industrial hemp inflorescences: Optimization of extraction, antiradical and antibacterial activity. *Pharmaceuticals*, 15(9), 1117.
- Kane, D. M., Getty, K. J. K., Mayer, B., & Mazzotta, A. (2016). Sanitizing in dry-processing environments using isopropyl alcohol quaternary ammonium formula. *Journal of Food Protection*, 79(1), 112–116. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-257>
- Karami, Z., Emam-Djomeh, Z., Mirzaee, H. A., Khomeiri, M., Mahoonak, A. S., Aydani, E. (2015). Optimization of microwave assisted extraction (MAE) and soxhlet extraction of phenolic compound from licorice root. *Journal of food science and technology*, 52, 3242-325.
- Karch, H., Bielaszewska, M., Bitzan, M., & Schmidt, H. (1999). Epidemiology and Diagnosis of *Escherichia coli* Infections. 8893(99), 229–243.
- Karpanen, T. J., Worthington, T., Hendry, E. R., Conway, B. R., Lambert, P. A. (2008). Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 62(5), 1031–1036. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn325>
- Kaskatepe, B., Kiyimaci, M. E., Suzuk, S., Erdem, S. A., Cesur, S., & Yildiz, S. (2016). Antibacterial effects of cinnamon oil against carbapenem resistant nosocomial *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Industrial Crops and Products*, 81, 191–194. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.058>
- Kavanaugh, N. L., Ribbeck, K. (2012). Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), 4057–4061. <https://doi.org/10.1128/AEM.07499-11>
- Kazimierczak, R., Hallmann, E., Sokołowska, O., Rembiałkowska, E. (2011). Zawartość związków bioaktywnych w roślinach zielarskich z uprawy ekologicznej i konwencjonalnej. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 56(3), 200-205.
- Kim, N. H., & Rhee, M. S. (2016). Synergistic bactericidal action of phytic acid and sodium chloride against *Escherichia coli* O157: H7 cells protected by a biofilm. *International Journal of Food Microbiology*, 227, 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.026>
- King, A. M., Adams, M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz, E. J. (2012). Virus taxonomy. *Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 9.
- Kołożyn-Krajewska, D., Sikora, T. (2010). *Zarządzanie bezpieczeństwem żywności: teoria i praktyka*. Wydawnictwo CH Beck.
- Komisja Europejska. (2022). ROZPORZĄDZENIE PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY ustanawiające ramy ustalania wymogów dotyczących ekoprojektu dla zrównoważonych

produktów i uchylające dyrektywę 2009/125/WE. Pobrano z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:52022PC0142&from=PL>

Komisja Europejska. (2023). DYREKTYWA PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY w sprawie uzasadniania wyraźnych oświadczeń środowiskowych i informowania o nich (dyrektywa w sprawie oświadczeń środowiskowych). Pobrano z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:52023PC0166>

Korany, A. M., Hua, Z., Green, T., Hanrahan, I., El-Shinawy, S. H., El-Kholy, A., Hassan, G., & Zhu, M. J. (2018). Efficacy of ozonated water, chlorine, chlorine dioxide, quaternary ammonium compounds and peroxyacetic acid against *Listeria monocytogenes* biofilm on polystyrene surfaces. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02296>

Kosakowska, O., Zenon, W., Pióro-Jabrucka, E., Przybył, J. L., Krasniewska, K., Gniewosz, M., & Baczek, K. (2021). Antioxidant and Antibacterial Activity of Essential Oils and Hydroethanolic Extracts of Greek Oregano. *Molecules*, 26(988).

Kotiranta, A., Lounatmaa, K., Haapasalo, M. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and infection*, 2(2), 189–198. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)00269-0](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)00269-0)

Kumar, V., Tripathi, M. K., Kohli, S. (2011). Antibacterial activity of *Cannabis sativa* against some pathogens isolated from burns of patient. *Medicinal Plants-International Journal of Phytomedicines and Related Industries*, 3(3), 243–247.

Laban, S. E., & Hamoud, M. M. (2019). Biofilmicidal Efficacy of Five Disinfectants against *Campylobacter*. 7(8), 634–640.

Lajhar, S. A., Brownlie, J., & Barlow, R. (2017). Survival capabilities of *Escherichia coli* O26 isolated from cattle and clinical sources in Australia to disinfectants, acids and antimicrobials. *BMC Microbiology*, 17(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0963-0>

Lei Y., Mads F. H., Henriette Lyng R., Ni W., Mette B. & Guoqing H. (2020) Mixed-species biofilms in the food industry: Current knowledge and novel control strategies, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60:13, 2277–2293, DOI: 10.1080/10408398.2019.1632790

Li, N. W., Liu, G. L., & Liu, J. (2017). Inactivation of *Bacillus cereus* biofilms on stainless steel by acidic electrolyzed water. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(6), 1–6. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13304>

Li, P., Zhao, Y. meng, Wang, C., & Zhu, H. ping. (2021). Antibacterial activity and main action pathway of benzyl isothiocyanate extracted from papaya seeds. *Journal of Food Science*, 86(1), 169–176. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15539>

Lindahl, M., Ekermann, S. (2013). Structure for Categorization of EcoDesign Methods and Tools. *Re-engineering Manufacturing for Sustainability: Proceedings of the 20th CIRP International*

- Conference on Life Cycle Engineering, Singapore 17-19 April, 2013*, 117-122.
http://dx.doi.org/10.1007/978-981-4451-48-2_19
- Lv, R., Muhammad, A. I., Zou, M., Yu, Y., Fan, L., Zhou, J., Ding, T., Ye, X., Guo, M., & Liu, D. (2020). Hurdle enhancement of acidic electrolyzed water antimicrobial efficacy on *Bacillus cereus* spores using ultrasonication. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(10), 4505–4513. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10393-6>
- Ma, Z., Bumunang, E. W., Stanford, K., Bie, X., Niu, Y. D., & McAllister, T. A. (2019). Biofilm formation by shiga toxin-producing *Escherichia coli* on stainless steel coupons as affected by temperature and incubation time. *Microorganisms*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7040095>
- Mahboubi, M., & Kazempour, N. (2018). Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja khuzistanica* Jamzad essential oil, ethanol and aqueous extracts. *Biharean Biologist*, 12(1), 37–39.
- Mai-Prochnow, A., Clauson, M., Hong, J., & Murphy, A. B. (2016). Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep38610>
- Medina-Rodríguez, A. C., Ávila-Sierra, A., Ariza, J. J., Guillamón, E., Baños-Arjona, A., Vicaria, J. M., & Jurado, E. (2020). Clean-in-place disinfection of dual-species biofilm (*Listeria* and *Pseudomonas*) by a green antibacterial product made from citrus extract. *Food Control*, 118, 107422. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107422>
- Meireles, A., Giaouris, E., & Simões, M. (2016). Alternative disinfection methods to chlorine for use in the fresh-cut industry. *Food Research International*, 82, 71–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.021>
- Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi. (2023). Wyniki eksportu produktów rolno-spożywczych z Polski w 2022 r. Pobrano z: <https://www.gov.pl/web/kowr/wyniki-eksportu-produktow-rolno-spozywczych-z-polski-w-2023-r>
- Mora, M., Veijalainen, A. M., & Heinonen-Tanski, H. (2018). Performic acid controls better *Clostridium tyrobutyricum* related bacteria than peracetic acid. *Sustainability* (Switzerland), 10(11). <https://doi.org/10.3390/su10114116>
- Mørretrø, T., Langsrud, S. (2004). *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*, 1(2), 107–121. <https://doi.org/10.1017/s1479050504001322>
- Morkis, G. (2012). Scope of implementation of obligatory food safety and food quality management systems in food industry enterprises in Poland. *Zywnosc. Nauka. Technologia. Jakosc/Food. Science Technology. Quality*, 19(5). <https://doi.org/10.15193/zntj/2012/84/203-214>

- Najwyższa Izba Kontroli. (2022, styczeń). Odpowiedzialność cywilna za niebezpieczną żywność. Szkody wyrządzone przez produkty przeznaczone do spożycia. Pobrano z: <https://www.nik.gov.pl/2022/01/odpowiedzialnosc-cywilna-za-niebezpieczna-zywnosc-szkody-wyrzadzone-przez-produkty-przeznaczone-do-spozycia.html>
- Navajas, A., Uriarte, L., Gandía, L. M. (2017). Application of Eco-Design and Life Cycle Assessment Standards for Environmental Impact Reduction of an Industrial Product. *Sustainability*, 9(10), 1724. <https://doi.org/10.3390/su9101724>
- Nizer, W. S. da C., Inkovskiy, V., & Overhage, J. (2020). Surviving reactive chlorine stress: Responses of gram-negative bacteria to hypochlorous acid. *Microorganisms* (Vol. 8, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081220>
- Nostro, A., Roccaro, A. S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M. A., Pizzimenti, F. C., Cioni, P. L., Procopio, F., & Blanco, A. R. (2007). Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*, 56(4). <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46804-0>
- Nuryastuti, T., van der Mei, H. C., Busscher, H. J., Irvati, S., Aman, A. T., Krom, B. P. (2009). Effect of cinnamon oil on icaA expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Applied and environmental microbiology*, 75(21), 6850–6855. <https://doi.org/10.1128/AEM.00875-09>
- Oh, E., Andrews, K. J., Jeon, B. (2018). Enhanced biofilm formation by ferrous and ferric iron through oxidative stress in *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01204>
- Orejel, J. C. R., & CanoBuendía, J. A. (2020). Applications of electrolyzed water as a sanitizer in the food and animal-by products industry. *Processes*, 8(5), 1–19. <https://doi.org/10.3390/PR8050534>
- Oreopoulou, A., Goussias, G., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2020). Hydro-alcoholic extraction kinetics of phenolics from oregano: Optimization of the extraction parameters. *Food and Bioproducts Processing*, 123. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.07.017>
- Organizacja Narodów Zjednoczonych (2019) Cele zrównoważonego rozwoju. Pobrano z: <https://www.un.org.pl/cel12>
- Orhan-Yanikan, E., da Silva-Janeiro, S., Ruiz-Rico, M., Jiménez-Belenguer, A. I., Ayhan, K., & Barat, J. M. (2019). Essential oils compounds as antimicrobial and antibiofilm agents against strains present in the meat industry. *Food Control*, 101(February), 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.02.035>
- O'Toole, G. A. (2010). Microtiter dish Biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, 47. <https://doi.org/10.3791/2437>

- Pablos, C., Romero, A., de Diego, A., Vargas, C., Bascón, I., Pérez-Rodríguez, F., & Marugán, J. (2018). Novel antimicrobial agents as alternative to chlorine with potential applications in the fruit and vegetable processing industry. *International Journal of Food Microbiology*, 285(March), 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.029>
- Park, Sang Hyun, Dong Hyun Kang. (2018). Effect of Temperature on Chlorine Dioxide Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on Spinach, Tomatoes, Stainless Steel, and Glass Surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, 275(March), 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.015>.
- PARP. (2022). Sektor spożywczy w Polsce wciąż rośnie: firmy z branży rozwijają się dzięki dotacjom z funduszy europejskich. Pobrano z: <https://www.parp.gov.pl/component/content/article/81809:sektor-spozywczy-w-polsce-wciaz-rosnie-firmy-z-branzy-rozwijaja-sie-dzieki-dotacjom-z-funduszy-europejskich>
- Patil, M. P., Patil, K. T., Ngabire, D., Seo, Y. B., & Kim, G. D. (2016). Phytochemical, antioxidant and antibacterial activity of black tea (*Camellia sinensis*). *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(2), 341–346.
- Patra, J. K., & Kwang-Hyun B. (2016). Anti-Listerial Activity of Four Seaweed Essential Oils against *Listeria monocytogenes*. 1–5. <https://doi.org/10.5812/jjm.31784>.
- Pinto, G., Almeida, C., & Azeredo, J. (2020). Bacteriophages to control Shiga toxin-producing *E. coli*—safety and regulatory challenges. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(8), 1081–1097. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1805719>
- Płaza, G. (2017). Zarządzanie Bezpieczeństwem Produkcji Żywności w Kierunku Poprawy Jakości Produktu. *Systemy Wspomagania w Inżynierii Produkcji*, 6(8), 27–36. <http://yadda.icm.edu.pl/baztech/element/bwmeta1.element.baztech-42a61389-b075-46c2-9947-444f5d9b9ac1>.
- Polski Komitet Normalizacyjny. (2015). Norma PN-EN 13697+A1:2015-06 Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne -- Ilościowa metoda określania działania bakteriobójczego i grzybobójczego chemicznych środków dezynfekcyjnych używanych w sektorze żywnościowym, warunkach przemysłowych i domowych oraz zakładach użyteczności publicznej w odniesieniu do nieporowatych powierzchni -- Wymagania i metoda badania bez działania mechanicznego
- Polskie Forum Public Relations. (2021). Data Trends 2021. Pobrano z: <https://www.pfpz.pl/raport-data-trends-2021-19222>
- Posada-Izquierdo, G. D., Pérez-Rodríguez, F., López-Gálvez, F., Allende, A., Selma, M. v., Gil, M. I., & Zurera, G. (2013). Modelling growth of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-cut lettuce submitted to commercial process conditions: Chlorine washing and modified atmosphere packaging. *Food Microbiology*, 33(2), 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.08.010>

- Possas, A., Pérez-Rodríguez, F., Tarlak, F., & García-Gimeno, R. M. (2021). Quantifying and modelling the inactivation of *Listeria monocytogenes* by electrolyzed water on food contact surfaces. *Journal of Food Engineering*, 290(July 2020). <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110287>
- Prawo Żywnościowe. (2023). Akty prawne. Pobrano z: <https://www.prawozywnosciowe.info/akty-prawne/>
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., Sintim, H. O. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, 7(4), 493–512. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.6>
- Rada Europejska. Europejski Zielony Ład, Cele klimatyczne (2023). Pobrano z: <https://www.consilium.europa.eu/pl/policies/green-deal/>
- Rahman, S., Khan, I., & Oh, D. H. (2016). Electrolyzed Water as a Novel Sanitizer in the Food Industry: Current Trends and Future Perspectives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(3), 471–490. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12200>
- Rajapaksha, P., Elbourne, A., Gangadoo, S., Brown, R., Cozzolino, D., & Chapman, J. (2019). A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms. *Analyst* (Vol. 144, Issue 2). <https://doi.org/10.1039/c8an01488d>
- Ripolles-Avila, C., Ríos-Castillo, A. G., Fontecha-Umaña, F., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2020). Removal of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Cronobacter sakazakii* biofilms from food contact surfaces through enzymatic catalysis. *Journal of Food Safety*, 40(2). <https://doi.org/10.1111/jfs.12755>
- Rodon, E. P. (2017). Life Cycle Assessment for Wastewater Disinfection Using Sodium Hypochlorite, Peracetic Acid or Performic Acid (Doctoral dissertation, McGill University (Canada)).
- Rodrigues, J. B. dos S., Souza, N. T. de, Scarano, J. O. A., Sousa, J. M. de, Lira, M. C., Figueiredo, R. C. B. Q. de, de Souza, E. L., & Magnani, M. (2018). Efficacy of using oregano essential oil and carvacrol to remove young and mature *Staphylococcus aureus* biofilms on food-contact surfaces of stainless steel. *Lwt*, 93, 293–299. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.052>
- Rodríguez-López, P., Rodríguez-Herrera, J. J., Vázquez-Sánchez, D., Cabo, M. L. (2018). Current knowledge on *Listeria monocytogenes* biofilms in Food-Related environments: Incidence, resistance to biocides, ecology and biocontrol. *Foods*, 7(6), 1–19. <https://doi.org/10.3390/foods7060085>
- Rodríguez-Solana, R., Salgado, J. M., Domínguez, J. M., Cortés-Diéguez, S. (2015). Comparison of soxhlet, accelerated solvent and supercritical fluid extraction techniques for volatile (GC–MS and GC/FID) and phenolic compounds (HPLC–ESI/MS/MS) from *Lamiaceae* Species. *Phytochemical analysis*, 26(1), 61-71

- Roila, R., Ranucci, D., Valiani, A., Galarini, R., Servili, M., & Branciari, R. (2019). Antimicrobial and anti-biofilm activity of olive oil by-products against *Campylobacter spp.* isolated from chicken meat. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 18(1), 43–52. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2019.0629>
- Romeu, Maria João, Diana Rodrigues, & Joana Azeredo (2020). "Effect of Sub-Lethal Chemical Disinfection on the Biofilm Forming Ability, Resistance to Antibiotics and Expression of Virulence Genes of *Salmonella Enteritidis* Biofilm-Surviving Cells." *Biofouling*, 36(1), 101–112. <https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1719077>.
- Rossi, C., Serio, C. C.-L. A., Anniballi, F., Valbonetti, L., & Paparella, A. (2016). Effect of *Origanum vulgare* Essential Oil on Biofilm Formation and Motility Capacity of *Pseudomonas fluorescens* Strains Isolated from Discolored Mozzarella Cheese. *International Journal of Laboratory Hematology*, 38(1), 42–49. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Sadekuzzaman, M., Yang, S., Kim, H. S., Mizan, M. F. R., & Ha, S. do. (2017). Evaluation of a novel antimicrobial (lauric arginate ester) substance against biofilm of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella spp.* *International Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 2058–2067. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13484>
- Sadiq, S., Imran, M., Habib, H., Shabbir, S., Ihsan, A., Zafar, Y., & Hafeez, F. Y. (2016). Potential of monolaurin based food-grade nano-micelles loaded with nisin Z for synergistic antimicrobial action against *Staphylococcus aureus*. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.045>
- Sandasi M, Leonard CM, Viljoen AM. (2010). The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol*, 50(1), 30-35. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02747.x.
- Sansebastiano, G., Zoni, R., Bigliardi, L. (2007). Cleaning and disinfection procedures in the food industry general aspects and practical applications. In *Food Safety: A Practical and Case Study Approach* (pp. 253-280). Springer US.
- Santos-Gomes, P.C.; Fernandes-Ferreira, M. Organ- and season-dependent variation in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. cultivated at two different sites. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2908–2916.
- Schirone, M., Visciano, P., Tofalo, R., & Suzzi, G. (2017). Editorial: Biological hazards in food. *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02154>
- Silagyi, K., Kim, S., Lo, Y. M., Wei, C. (2009). Production of biofilm and quorum sensing by *Escherichia coli* O157 : H7 and its transfer from contact surfaces to meat , poultry , ready-to-eat deli, and produce products. *Food Microbiology*, 26(5), 514–519. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.03.004>

- Somrani, Mariem, María-Carmen Inglés, Hajer Debbabi, Ferid Abidi, and Alfredo Palop. (2020). "Garlic, Onion, and Cinnamon Essential Oil Anti-Biofilms' Effect against *Listeria monocytogenes*." *Foods*, 9(5), 567. <https://doi.org/10.3390/foods9050567>.
- Stanojević-Nikolić, S., Dimić, G., Mojović, L., Pejin, J., Djukić-Vuković, A., & Kocić-Tanackov, S. (2016). Antimicrobial Activity of Lactic Acid Against Pathogen and Spoilage Microorganisms. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(5), 990–998. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12679>
- Tadić, V., Bojović, D., Arsić, I., Đorđević, S., Aksentijević, K., Stamenić, M., Janković, S. (2012). Chemical and antimicrobial evaluation of supercritical and conventional *Sideritis Scardica* Griseb., *Lamiaceae* extracts. *Molecules*, 17(3), 2683-2703.
- Tarko, T., Duda-Chodak, A., Zajac, N. (2013). Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by in vitro simulation methods. A review. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 64(2).
- Teh, A. H. T., Lee, S. M., Dykes, G. A. (2019). Association of some *Campylobacter jejuni* with *Pseudomonas aeruginosa* biofilms increases attachment under conditions mimicking those in the environment. *PLoS ONE*, 14(4), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215275>
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Serrano, C., Matos, O., Neng, N. R. & Nunes, M. L. (2013). Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(11), 2707-2714.
- Telesiński, A., Śnioszek, M., Biczak, R., Pawłowska, B. (2016). Zagrożenia środowiskowe i toksykologiczne wynikające ze stosowania czwartorzędowych soli amoniowych. *Kosmos*, 65(4), 495-502.
- Tsiaprazi-Stamou, A., Monfort, I. Y., Romani, A. M., Bakalis, S., & Gkatzionis, K. (2019). The synergistic effect of enzymatic detergents on biofilm cleaning from different surfaces. *Biofouling*, 35(8), 883–899. <https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1666108>
- Ustawa z 27 września 2006 roku o bezpieczeństwie żywności i żywienia, Dz.U. 2001, nr 31, poz. 265
- Uwineza, P. A., Gramza-Michałowska, A., Bryła, M., Waśkiewicz, A. (2021). Antioxidant activity and bioactive compounds of *Lamium album* flower extracts obtained by supercritical fluid extraction. *Applied Sciences*, 11(16), 7419.
- Van Vuuren, S. F., Kamatou, G. P., Viljoen, A. M. (2010). Volatile composition and antimicrobial activity of twenty commercial frankincense essential oil samples. *South African Journal of Botany*, 76(4), 686-691.
- Van Vuuren, S. F., Suliman, S., Viljoen, A. M. (2009). The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Letters in applied microbiology*, 48(4), 440-446.

- Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C., Bezirtzoglou, E. (2021). Towards advances in medicinal plant antimicrobial activity: A review study on challenges and future perspectives. *Microorganisms*, 9(10), 2041. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102041>
- Vidaković Knežević S, Knežević S, Vranešević J, Kravić SŽ, Lakićević B, Kocić-Tanackov S, Karabasil N. Effects of Selected Essential Oils on *Listeria monocytogenes* in Biofilms and in a Model Food System. *Foods*, 12(10), 1930. <https://doi.org/10.3390/foods12101930>
- Výrostková, J., Pipová, M., Semjon, B., Jevinová, P., Regecová, I., & Malová, J. (2020). Antibacterial effects of hydrogen peroxide and caprylic acid on selected foodborne bacteria. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 23(3), 439–446. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2020.134689>
- Wagner, E. M., Pracser, N., Thalgut, S., Fischel, K., Rammer, N., Pospíšilová, L., Rychli, K. (2020). Identification of biofilm hotspots in a meat processing environment: Detection of spoilage bacteria in multi-species biofilms. *International Journal of Food Microbiology*, 328(May). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108668>
- Wang, H., Ding, S., Dong, Y., Ye, K., Xu, X., Zhou, G. (2013). Biofilm formation of *Salmonella* serotypes in simulated meat processing environments and its relationship to cell characteristics. *Journal of Food Protection*, 76(10), 1784–1789. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-093>
- Wang, H., Cai, L., Li, Y., Xu, X., & Zhou, G. (2018). Biofilm formation by meat-borne *Pseudomonas fluorescens* on stainless steel and its resistance to disinfectants. *Food Control*, 91, 397–403. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.035>
- Weerarathne, P., Payne, J., Saha, J., Kountoupis, T., Jadeja, R., & Jaroni, D. (2021). Evaluating the efficacy of sodium acid sulfate to reduce *Escherichia coli* O157:H7 and its biofilms on food-contact surfaces. *Lwt*, 139, 110501. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110501>
- Wilsmann, D. E., Carvalho, D., Zottis Chitolina, G., Apellanis Borges, K., Quedi Furian, T., Carvalho Martins, A., Webber, B., & Pinheiro Do Nascimento, V. (2020). Electrochemically-Activated Water Presents Bactericidal Effect against *Salmonella* Heidelberg Isolated from Poultry Origin. *Foodborne Pathogens and Disease*, 17(3), 228–233. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2682>
- Wirtanen, G., Salo, S. (2003). Disinfection in food processing—efficacy testing of disinfectants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2, 293-306.
- Wolf-Hall, C., Nganje, W. (2017). Microbial food safety: a food systems approach. CABI.
- Worobiej, E., Mądrzak, J., Piecyk, M. (2015). Zawartość wybranych składników odżywczych i związków biologicznie aktywnych w produktach z konopi siewnych (*Cannabis sativa* L.) oraz kasztanów jadalnych (*Castanea sativa* Mill.). *Bromat Chem Toksykol*, 48(3), 573-577

- Yamaner, C., Ayvaz, M., Konak, R., Tan, N., Kosoglu, I., & Dimoglo, A. (2016). Efficacy of neutralised electrolysed water and mild heat against foodborne pathogens isolated from *Ficus carica*. *Italian Journal of Food Science*, 28(2), 208–220. <https://doi.org/10.14674/1120-1770/ijfs.v260>
- Yim, Jin Hyeok i in., 2021. "Effectiveness of Calcium Hypochlorite, Quaternary Ammonium Compounds, i Sodium Hypochlorite in Eliminating Vegetative Cells i Spores of *Bacillus Anthracis* Surrogate." *Journal of Veterinary Science* 22(1): 1–7
- Yuan, L., Hansen, M. F., Røder, H. L., Wang, N., Burmølle, M., & He, G. (2020). Mixed-species biofilms in the food industry: Current knowledge and novel control strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(13), 2277–2293. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1632790>
- ZALECENIE KOMISJI (UE) 2021/2279 z dnia 15 grudnia 2021 r. w sprawie stosowania metod oznaczania śladu środowiskowego do pomiaru efektywności środowiskowej w cyklu życia produktów i organizacji oraz informowania o niej. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32021H2279>.
- Zhang, C., Baoming L., Ravirajsinh J., & Yen C. H. (2016). "Effects of Electrolyzed Oxidizing Water on Inactivation of *Bacillus Subtilis* and *Bacillus Cereus* Spores in Suspension on Carriers." *Journal of Food Science*, 81(1), M144–M149.
- Zhao, X., Fenghuan Z., Jun W.& Nanjing Z. (2017). "Biofilm Formation and Control Strategies of Foodborne Pathogens: Food Safety Perspectives." *RSC Advances*, 7(58), 36670–36683. <http://dx.doi.org/10.1039/C7RA02497E>.
- Žitek, T., Borjan, D., Golle, A., Knez, Ž & Knez, M. (2021). Optimization of extraction of phenolic compounds with antimicrobial properties from *Origanum vulgare*. *Processes*, 9(6), 1032.
- Zou, M., Wenyang T., Xingqian Y. & Donghong L. (2020). "Evaluation of Antimicrobial and Antibiofilm Properties of Proanthocyanidins from Chinese Bayberry (*Myrica Rubra* Sieb. et Zucc.) Leaves against *Staphylococcus Epidermidis*." *Food Science and Nutrition*, 8(1), 139–149.

Wykaz wykresów

Wykres 1.1. Procentowy rozkład zgłoszeń do systemu RASFF w latach 2010 – 2020 według kategorii zagrożenia	23
Wykres 1.2. Liczba zgłoszeń do systemu RASFF w latach 2010-2022 w sekcji zagrożeń patogennymi mikroorganizmami.....	24
Wykres 1.3. Liczba zgłoszeń do systemu RASFF w latach 2010-2022 w podziale na kraje członkowskie zgłaszające wykryte nieprawidłowości.....	26
Wykres 1.4. Liczba zgłoszeń do systemu RASFF w latach 2010-2022 w podziale na kraje produkujące zanieczyszczoną mikrobiologicznie żywność.....	27
Wykres 1.5. liczba zgłoszeń do systemu RASFF w kategorii zagrożeń patogennymi mikroorganizmami w podziale na produkty, w latach 2010-2022	28
Wykres 1.6. Zgłoszenia zagrożeń mikrobiologicznych w produkcji mięsnej w latach 2010 - 2022	30
Wykres 1.7. Zgłoszenia zagrożeń mikrobiologicznych w produkcji mleczarskiej, piekarniczej oraz produkcji jaj w latach 2010 - 2022	33
Wykres 1.8. Zgłoszenia zagrożeń mikrobiologicznych w przetwórstwie owocowo-warzywnym, opraw produkcji nasion i orzechów w latach 2010 – 2022	35
Wykres 1.9. Zgłoszenia zagrożeń mikrobiologicznych w produkcji kawy, herbaty, ziół i przypraw; żywności specjalnego przeznaczenia oraz dań gotowych, a także produktów pozostałych, niezawartych w innych gałęziach, w latach 2010 – 2022.....	36
Wykres 6.1. Wpływ badanych ekstraktów roślinnych na formowanie biofilmu (1) oraz usuwanie dojrzałego biofilmu (2) wytworzonego przez bakterie <i>L. monocytogenes</i>	108
Wykres 6.2. Wpływ badanych ekstraktów roślinnych na formowanie biofilmu (1) oraz usuwanie dojrzałego biofilmu (2) wytworzonego przez bakterie <i>S. aureus</i>	111
Wykres 6.3 Wpływ badanych ekstraktów roślinnych na formowanie biofilmu (1) oraz usuwanie dojrzałego biofilmu (2) wytworzonego przez bakterie <i>P. aeruginosa</i>	114
Wykres 6.4. Porównanie wartości ekowskaźnika single score.....	144

Wykaz Fotografii

Fotografia 6.1. Obraz mikroskopowy dojrzałego biofilmu bakterii <i>L. monocytogenes</i> przed (a) oraz po (b) zastosowaniu ekstraktu z konopi otrzymanego metodą ekstrakcji nadkrytycznym CO ₂ (CS, stężenie 1* <i>MIC</i> = 0,25 mg/ml, redukcja 64%)	109
Fotografia 6.2. Obraz mikroskopowy dojrzałego biofilmu bakterii <i>S. aureus</i> przed (a) oraz po (b) zastosowaniu ekstraktu z konopi otrzymanego metodą ekstrakcji nadkrytycznym CO ₂ (CS, stężenie 1* <i>MIC</i> = 0,25 mg/ml, redukcja 76%).....	112
Fotografia 6.3. Obraz mikroskopowy dojrzałego biofilmu bakterii <i>P. aeruginosa</i> przed (a) oraz po (b) zastosowaniu ekstraktu z konopi otrzymanego metodą ekstrakcji nadkrytycznym CO ₂ (CS, stężenie 1* <i>MIC</i> = 0,25 mg/ml, redukcja 41%).....	115

Wykaz rysunków

Rysunek W.1. Schemat realizacji części teoretycznej	12
Rysunek W.2. Schemat realizacji części badawczej	13
Rysunek 1.1. Składowe jakości produktu żywnościowego bezpośrednio lub pośrednio wynikające z jego jakości mikrobiologicznej	21
Rysunek 2.1. Schemat modelowego podejścia do zarządzania bezpieczeństwem żywności w przemyśle spożywczym	42
Rysunek 3.1. Schemat blokowy procedury czyszczenia, mycia i dezynfekcji w przemyśle spożywczym	44
Rysunek 3.2. Uproszczony schemat wykorzystanej metodologii SALSA.....	47
Rysunek 6.1. Emisja kopalnego CO ₂ do powietrza (wynik LCI, 5% odcięcie, bez sumowania).....	129
Rysunek 6.2. Wydobycie węgla kamiennego (wynik LCI, 5% odcięcie, bez sumowania)	130
Rysunek 6.3. Emisja SO ₂ i NO _x do powietrza (wynik LCI, 5% odcięcie, bez sumowania)	131
Rysunek 6.4. Emisja aluminium do powietrza (wynik LCI, 5% odcięcie, bez sumowania)	133
Rysunek 6.5. Fipronil do gleby, LCI, odcięcie 0,01%, bez sumowania.....	136
Rysunek 6.6. Siarka do wody, LCI, odcięcie 4%, bez sumowania	137
Rysunek 6.7. emisja biogenego CO ₂ do powietrza, LCI, bez sumowania	138
Rysunek 6.8. Arsen do gleby, LCI, bez sumowania.....	139
Rysunek 6.9. Aldrin do gleby, LCI, bez sumowania.....	139
Rysunek 6.10. Dwutlenek węgla, przekształcenie gruntów, LCI, odcięcie 5%, bez sumowania	140
Rysunek 6.11. NO _x do powietrza, LCI, bez sumowania	141
Rysunek 6.12. Pyły poniżej 2.5um do powietrza, LCI, 4% odcięcie, bez sumowania	142

Wykaz Tabel

Tabela 1.1. Warunki graniczne wzrostu wybranych grup mikroorganizmów.....	21
Tabela 2.1. Akty prawne regulujące działanie każdego przedsiębiorstwa produkującego żywność na terenie Polski.....	39
Tabela 3.1. Związki chemiczne potencjalnie lub realnie wykorzystywane w dezynfekcji zakładów przemysłu spożywczego będące przedmiotem badań w latach 2016-2022, wyodrębnionych w ramach systematycznego przeglądu literaturowego	48
Tabela 3.2. Związki biologiczne oraz alternatywne metody fizyczne potencjalnie lub realnie wykorzystywane w dezynfekcji zakładów przemysłu spożywczego będące przedmiotem badań w latach 2016-2022, wyodrębnionych w ramach systematycznego przeglądu literaturowego	56
Tabela 4.1. Zestawienie celów szczegółowych wyznaczonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej.....	64
Tabela 4.2. Hipotezy badawcze sformułowane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej.....	65
Tabela 5.1. Odczynniki chemiczne wykorzystane w trakcie pracy badawczej.....	66
Tabela 5.2. Olejki i Ekstrakty CO ₂ zakupione w celu przeprowadzenia badań pilotażowych	67
Tabela 5.3. Mikroorganizmy wskaźnikowe wykorzystane w trakcie pracy badawczej	68
Tabela 5.4. Warianty formulacji preparatu dezynfekującego analizowane w ramach oceny cyklu życia	75

Tabela 5.5. Kategorie wpływu w metodzie EF 3.0	78
Tabela 6.1. Antybakteryjne oddziaływanie handlowych olejków i ekstraktów CO ₂ wobec <i>B. subtilis</i> (wyrażone jako procent zahamowania wzrostu)	82
Tabela 6.2. Antybakteryjne oddziaływanie handlowych olejków i ekstraktów CO ₂ wobec <i>S. aureus</i> (wyrażone jako procent zahamowania wzrostu)	83
Tabela 6.3. Antybakteryjne oddziaływanie handlowych olejków i ekstraktów CO ₂ wobec <i>C. perfringens</i> (wyrażone jako procent zahamowania wzrostu).....	84
Tabela 6.4. Antybakteryjne oddziaływanie handlowych olejków i ekstraktów CO ₂ wobec <i>L. monocytogenes</i> (wyrażone jako procent zahamowania wzrostu)	85
Tabela 6.5. Antybakteryjne oddziaływanie handlowych olejków i ekstraktów CO ₂ wobec <i>E. faecalis</i> (wyrażone jako procent zahamowania wzrostu)	86
Tabela 6.6. Antybakteryjne oddziaływanie handlowych olejków i ekstraktów CO ₂ wobec <i>M. luteus</i> (wyrażone jako procent zahamowania wzrostu)	87
Tabela 6.7. Antybakteryjne oddziaływanie handlowych olejków i ekstraktów CO ₂ wobec <i>E. coli</i> (wyrażone jako procent zahamowania wzrostu)	88
Tabela 6.8. Antybakteryjne oddziaływanie handlowych olejków i ekstraktów CO ₂ wobec <i>C. jejuni</i> (wyrażone jako procent zahamowania wzrostu)	89
Tabela 6.9. Antybakteryjne oddziaływanie handlowych olejków i ekstraktów CO ₂ wobec <i>S. Enteritidis</i> (wyrażone jako procent zahamowania wzrostu)	90
Tabela 6.10. Antybakteryjne oddziaływanie handlowych olejków i ekstraktów CO ₂ wobec <i>P. aeruginosa</i> (wyrażone jako procent zahamowania wzrostu)	91
Tabela 6.11. Warianty ekstraktów roślinnych uzyskanych w trakcie eksperymentu oraz skróty wykorzystane w wykresach i opisach w dalszej części pracy doktorskiej	95
Tabela 6.12. Całkowita zawartość zawiązków polifenolowych w pozyskanych ekstraktach roślinnych	96
Tabela 6.13. Minimalne stężenia hamujące (MIC) badanych ekstraktów roślinnych wyznaczone wobec wybranych bakterii Gram-dodatnich	100
Tabela 6.14. Minimalne stężenia hamujące (MIC) badanych ekstraktów roślinnych wyznaczone wobec wybranych bakterii Gram-ujemnych.....	102
Tabela 6.15. Wspólne wartości MIC badanych ekstraktów roślinnych wobec mikroorganizmów wskaźnikowych.....	103
Tabela 6.16. Wyniki skuteczności dezynfekcji proponowanych formułacji wyrażone jako logarytm dziesiętny redukcji w stosunku do kontroli wodnej.....	120
Tabela 6.17. Identyfikacja środowiskowych punktów krytycznych związanych z cyklem życia - scenariusza bazowego (SMF, 50% etanolu, skala laboratoryjna produkcji)	124
Tabela 6.18. Identyfikacja środowiskowych punktów krytycznych związanych wyłącznie z etapem produkcji (krok 2 uproszczony) ekstraktu dezynfekującego na bazie konopi - scenariusz bazowy (SMF, 50% etanolu, skala laboratoryjna)	126
Tabela 6.19. Identyfikacja środowiskowych punktów krytycznych związanych wyłącznie z etapem użytkowania (krok 2 uproszczony) środka dezynfekującego na bazie konopi - scenariusz bazowy (Soxhlet, 50% etanolu, skala laboratoryjna)	134
Tabela 6.20. Wartości skumulowanego ekowskaźnika [Pt] wariantu bazowego oraz scenariuszy alternatywnych formułacji środka dezynfekującego.....	145