



**POLITECHNIKA
BYDGOSKA**
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

ROZPRAWA DOKTORSKA

DYSCYPLINA: ROLNICTWO I OGRODNICTWO

mgr inż. Martyna Zielińska-Tadych

Monitoring szczepów *Listeria monocytogenes*
w surowcach, produktach i środowisku zakładów
przetwórstwa owocowo-warzywnego

*Monitoring of Listeria monocytogenes strains
in raw materials, products and environment
of fruit and vegetable processing plants*

PROMOTOR

dr hab. Anna Ligocka, prof. PBŚ
Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

PROMOTOR POMOCNICZY

dr n. med. Katarzyna Grudlewska-Buda
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu



BYDGOSZCZ 2023

Szczególne podziękowania

składam Pani dr hab. Annie Ligockiej, prof. PBS,

oraz

Pani dr n. med. Katarzynie Grudlewskiej-Buda,

a także

Paniom pracującym w Katedrze Mikrobiologii i Technologii Żywności.

Mężowi, Rodzicom, Rodzeństwu i Przyjaciółom,

za nieustającą wiarę we mnie,

Dziękuję.

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	11
2. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA	13
2.1. Charakterystyka <i>Listeria monocytogenes</i>	13
2.1.1. Serotypy bakterii z gatunku <i>Listeria monocytogenes</i>	14
2.1.2. Geny charakterystyczne dla bakterii z gatunku <i>L. monocytogenes</i>	15
2.1.3. Mechanizmy wirulencji	16
2.1.4. Chorobotwórczość <i>L. monocytogenes</i>	18
2.2. Występowanie <i>L. monocytogenes</i> w środowisku i żywności	19
2.2.1. Biofilm <i>L. monocytogenes</i> jako zagrożenie w zakładach produkcji i przetwarzania żywności	22
2.2.2. Skażenia żywności w Polsce wywołane przez <i>L. monocytogenes</i> ..	24
2.2.3. Metody ograniczania rozwoju <i>L. monocytogenes</i> w żywności pochodzenia roślinnego	25
2.2.3.1. Dezynfektanty	25
2.2.3.2. Biokonserwanty ograniczające występowanie w <i>L. monocytogenes</i> w warzywach i owocach minimalnie przetworzonych (WOMP)	26
2.3. Metody zwalczania biofilmu	31
2.4. Metody wykrywania <i>Listeria monocytogenes</i> w środowisku produkcyjnym żywności	32
2.4.1. Metody hodowlane	34
2.4.1.1. Charakterystyka podłoży hodowlanych	35
2.4.2. Metody molekularne	37
2.4.2.1. Metody oparte na amplifikacji DNA	37
2.4.2.2. Multiplex PCR	38
2.4.2.3. Real-Time PCR (PCR w czasie rzeczywistym)	38
2.4.2.4. RT-PCR (ang. <i>Reverse Transcription-PCR</i>)	39
2.4.2.5. NASBA (ang. <i>Nucleic Acid Sequence-Based Amplification</i>) ...	39
2.4.2.6. LAMP (ang. <i>Loop Mediated Isothermal Amplification</i>)	40
2.4.2.7. Wykrywanie polimorfizmu pojedynczych nici DNA	40

2.4.3. Metody hybrydyzacyjne	40
2.4.4. Szybkie testy.....	41
3. CELE PRACY I HIPOTEZY BADAWCZE	42
4. MATERIAŁY I METODY	44
4.1. Materiały	44
4.1.1. Materiał badawczy.....	44
4.1.2. Wzorcowe szczepy bakteryjne	44
4.1.3. Podłoża hodowlane.....	44
4.1.4. Pozostałe odczynniki i drobny sprzęt laboratoryjny.....	45
4.1.5. Oprogramowanie komputerowe	47
4.2. Metody	47
4.2.1. Określenie przynależności rodzajowej i gatunkowej izolatów.....	47
4.2.2. Izolacja DNA bakteryjnego.....	48
4.2.3. Różnicowanie <i>L. monocytogenes</i> od pozostałych <i>Listeria</i> spp. metodą dupleks-PCR.....	48
4.2.4. Określenie pokrewieństwa genetycznego izolatów bakteryjnych ...	49
4.2.5. Serogrupowanie szczepów bakteryjnych.....	50
4.2.6. Wykrywanie genów kodujących wybrane czynniki wirulencji techniką multipleks PCR	52
4.2.7. Określenie MIC i MBC czynników przeciwdrobnoustrojowych dla szczepów <i>Listeria monocytogenes</i> metodą mikro płytkową.....	54
4.2.8. Określenie zdolności szczepów <i>L. monocytogenes</i> do tworzenia biofilmu i wpływu różnych czynników na ten proces	55
4.2.8.1. Określenie zdolności do tworzenia biofilmu	55
4.2.8.2. Wpływ nizyny, lizozymu i bakteriofaga na wytwarzanie biofilmu	57
4.2.8.3. Ocena wpływu nizyny, lizozymu i bakteriofaga na eradykację wytworzonego wcześniej biofilmu.....	57
4.2.9. Ocena antybiotykoodporności	58
4.2.10. Określenie wpływu wybranych środków dezynfekcyjnych	59
4.2.11. Statystyczna analiza wyników.....	61

5. WYNIKI.....	62
5.1. Określenie przynależności rodzajowej i gatunkowej izolatów.....	62
5.2. Różnicowanie szczepów <i>L. monocytogenes</i> od pozostałych <i>Listeria</i> spp. metodą dupleks-PCR.....	63
5.3. Określenie pokrewieństwa genetycznego izolatów.....	64
5.4. Serogrupowanie szczepów bakteryjnych.....	68
5.5. Wykrywanie genów kodujących wybrane czynniki wirulencji techniką multiplex PCR.....	69
5.6. Określenie MIC i MBC czynników antybakteryjnych z wykorzystaniem metody mikropłytkowej.....	70
5.7. Określenie zdolności szczepów <i>L. monocytogenes</i> do tworzenia biofilmu bakteryjnego i wpływ różnych czynników na ten proces.....	71
5.7.1. Zdolność do tworzenia biofilmu.....	71
5.7.2. Wpływ nizyny, lizozymu i bakteriofaga na wytwarzanie biofilmu.	73
5.7.3. Ocena wpływu nizyny, lizozymu i bakteriofaga na eradykację wytworzonego wcześniej biofilmu.....	75
5.8. Ocena antybiotykooporności szczepów <i>L. monocytogenes</i>	77
5.9. Określenie wpływu wybranych środków dezynfekcyjnych.....	78
6. DYSKUSJA.....	80
7. WNIOSKI.....	86
8. LITERATURA.....	88

1. WSTĘP

Bakterie z rodzaju *Listeria* występują w przyrodzie powszechnie, a na człowieka przenoszą się za pośrednictwem gleby, wody, ścieków, odchodów zwierząt czy zanieczyszczonych roślin. Spośród kilkunastu gatunków największe zagrożenie dla człowieka stanowią pałeczki *L. monocytogenes* [Wróblewska i Misiewicz, 2006]. Według raportu RASFF (ang. *Rapid Alert System for Food and Feed*, Krajowy System Wczesnego Ostrzegania Niebezpiecznej Żywności) z 2017 roku, gatunek ten był drugim pod względem częstotliwości występowania patogenem obecnym w żywności przetworzonej [RASFF, 2017]. Obecność bakterii stwierdza się m.in. w mleku i produktach mlecznych, mięsie i produktach mięsnych oraz warzywnych. Ich spożycie wiąże się z ryzykiem wystąpienia listeriozy, zapalenia żołądka i jelit, zapalenia opon mózgowych, posocznicy, ronienia, posocznicy noworodków oraz wewnątrzmacicznymi infekcjami u ciężarnych kobiet [Molenda, 2009]. Listerioza została uznana za najbardziej śmiertelną chorobę odżywnościową wywoływaną przez patogeny jelitowe (śmiertelność 30%) [Sołtysiuk i wsp., 2019]. Pałeczki z rodzaju *Listeria* do środowiska dostają się za pośrednictwem organizmów chorych lub nosicieli, gdzie przy sprzyjających warunkach przeżywają, namnażają się i stanowią zagrożenie infekcji. Zjawisko bezobjawowego nosicielstwa jest powszechne zarówno u zwierząt (m. in.: u owiec, kóz, bydła, świń, ptaków i ryb), jak i u ludzi obejmując 5 - 10% populacji. Bakterie izoluje się najczęściej z przewodu pokarmowego, skąd wraz z kałem przedostają się do środowiska. Skażenie produktów spożywczych pochodzenia roślinnego najczęściej zaczyna się na etapie uprawy i jest skutkiem kontaktu warzyw czy owoców z glebą, odchodami, powietrzem, pyłem, owadami i wodą służącą do nawadniania. Innym istotnym czynnikiem jest też stosowanie (głównie w uprawach organicznych) nawozów naturalnych, rodzaj zabiegów agrotechnicznych, stosowanie skażonych nasion i siewek czy jakość wody wykorzystywanej do nawadniania, itp. [Miceli i Settanni, 2019]. Surowcami szczególnie narażonymi na zanieczyszczenie *L. monocytogenes* są m. in. szpinak, brokuły, kapusta, kalafior, sałata oraz przygotowane z nich surówki i sałatki oraz inne dania gotowe do spożycia, typu RTE (ang. *Ready-to-Eat*) [EFSA, 2009]. W warunkach produkcyjnych na ryzyko skażenia mikrobiologicznego przetwarzanej żywności wpływa sposób przygotowania, przechowywania i transportu żywności, ale również jakość użytych surowców, wody, opakowań, czystości sprzętu, aparatury, higiena pomieszczeń, personelu oraz wdrożonych w zakładach systemów czyszczenia i dezynfekcji [Kołakowska i Madajczak, 2011].

Zdolność *L. monocytogenes* do wzrostu w szerokim zakresie temperatur i pH, odporność na warunki środowiskowe, krótkotrwałą pasteryzację, mrożenie, podprogowe dawki konserwantów, środków myjących oraz zdolność rozwoju w warunkach tlenowych i beztlenowych sprawiają, że niektóre rodzaje żywności

są szczególnie często zanieczyszczone tymi pałeczkami [Budzińska i wsp., 2012]. Wśród nich należy wymienić m.in. wyroby garmażeryjne, niepasteryzowane mleko, sery, wędzone ryby, a także surowe warzywa i owoce. Kolejnym elementem sprzyjającym skażeniu żywności, zwłaszcza w zakładach przetwórczych, jest zdolność pałeczek *Listeria* spp. do przywierania i wzrostu na powierzchniach abiotycznych w postaci biofilmu. Struktury te są stałym źródłem ryzyka wtórnego zanieczyszczenia żywności w czasie procesów produkcyjnych. Mogą powodować zepsucie produktu, zagrożenie dla zdrowia konsumenta i spadek bezpieczeństwa produktów żywnościowych. Ponadto hamowanie procesów wymiany ciepła, blokowanie mechanicznie przepływu i biodegradacja składników powierzchni metalicznych i polimerowych powodują znaczne straty finansowe, liczące w skali ogólnoswiatowej miliony dolarów rocznie [Berthold, 2007].

Wykrywanie i oznaczanie liczby bakterii *Listeria* spp. odbywa się obecnie najczęściej z zastosowaniem klasycznych metod mikrobiologicznych w oparciu o normę PN-EN ISO 11290-1:2017-07 *Mikrobiologia łańcucha żywnościowego – Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes* i innych *Listeria* spp.* Klasyczne metody, opierające się na hodowli komórek i testach mikrobiologicznych, są jednak czasochłonne oraz nie dają wystarczającej pewności wyników, zwłaszcza podczas identyfikacji termicznie zniszczonych bakterii lub mikroorganizmów poddanych różnego rodzaju procesom przemysłowym, uszkadzającym strukturę komórki [Vazquez-Boland i wsp., 2001]. Nowoczesne metody molekularne oraz serologiczne są szybsze, bardziej czułe i specyficzne w wykrywaniu bakterii chorobotwórczych w przetworzonej żywności. Losowa amplifikacja polimorficznego DNA (RAPD), losowych fragmentów swoistych gatunkowo, pozwala na identyfikację rodzajów oraz gatunków mikroorganizmów, poprzez różnicowanie i ocenę stopnia podobieństwa szczepów [Rahman i wsp., 2013; Wróblewska i Misiewicz, 2006].

2. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA

2.1. CHARAKTERYSTYKA *LISTERIA MONOCYTOGENES*

L. monocytogenes jest gram-dodatnią, nie tworzącą spor pałeczką mierzącą 1 - 2 μm długości oraz 0,5 μm szerokości, występującą najczęściej pojedynczo, może również tworzyć krótkie łańcuszki lub skupiska w kształcie liter X, Y i V. Jest bakterią względnie beztlenową, ruchliwą w zakresie temperatur 22 - 28°C, ale nieruchliwą powyżej 30°C. Charakteryzuje się wzrostem w zakresie temperatur od -0,4°C do 45°C i pH między 4,6 a 9,5. Jest także jest w stanie przetrwać przy stosunkowo niskiej aktywności wody ($a_w < 0,90$) i w warunkach zasolenia do 20%. Te cechy sprawiają, że bakterie te są w stanie przetrwać i namnażać się w niekorzystnych warunkach środowiskowych, które często występują w zakładach produkcji żywności (tabela 1) [Gray i wsp., 2006; Ranasinghe i wsp., 2021].

Tabela 1. Wpływ wybranych czynników fizykochemicznych na wzrost *L. monocytogenes* [Sip, 2010]

Parametr	Wzrost			Możliwość przeżycia	Inaktywacja
	Min.	Opt.	Max.		
Temperatura [°C]	od -1,5 do +3	30-37	45	-18	70°C/2 min, 80°C/1 min.
pH	4,2-4,3	7,0	9,4-9,5	3,3-4,2	<3,0
Aktywność wody [a_w]	0,9-0,93	0,99	>0,99	0,9	<0,83
Stężenie NaCl [%]	<0,5	0,7	0,9	20	>30
Stężenie CO ₂ [%]	0	10-20	30-40	>70	100

L. monocytogenes jako organizm psychrotolerancyjny stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego i przemysłu, ponieważ przechowywanie żywności w warunkach chłodniczych i jej mrożenie są najbardziej powszechnymi metodami konserwowania. Pinton i wsp. [2020] stwierdzili, że podczas przechowywania w -18°C populacja *L. monocytogenes* przetrwała na brokułach i kalafiorze co najmniej do 168 dni. W lodach bakterie przeżyły przez 36 miesięcy przechowywania w temperaturze -20°C bez znaczącego spadku populacji [Salazar i wsp., 2020] a w zamrożonym łososiu - 10 miesięcy [Miladi i wsp., 2008].

Szerokie spektrum tolerancji na czynniki fizykochemiczne sprawia, że bakteria ta jest wszechobecna w środowisku. *L. monocytogenes* jest dobrze przystosowana do życia w glebie i na roślinach jako saprotrof (w środowisku zewnątrzkomórkowym) oraz do życia w cytozolu komórek ssaków jako patogen (wewnątrzkomórkowo). Środowiska te różnią się znacznie zawartością i dostępnością źródeł węgla, siarki i azotu, dlatego też bakterie wykazują duże zdolności adaptacyjne. Zwierzęta, takie jak bydło, owce, kozy oraz drób, przebywające w środowisku naturalnym (np. przy pastwiskowym systemie utrzymania) mogą być nosicielami tego patogenu. Na przestrzeni ostatnich lat *L. monocytogenes* była odpowiedzialna za skażenie produktów żywnościowych zarówno pochodzenia zwierzęcego, jak i roślinnego [Letchumanan i wsp., 2018].

2.1.1. Serotypy bakterii z gatunku *Listeria monocytogenes*

Badania prowadzone na przestrzeni lat wskazują, że istnieje zależność pomiędzy serotypem szczepów *L. monocytogenes*, a przynależnością do odpowiedniej linii filogenetycznej. Obecnie wyróżnia się 3 linie filogenetyczne *L. monocytogenes*, które wyodrębniono na podstawie różnic w sekwencji nukleotydowej trzech genów: *flaA* (kodujący flagelinę), *iap* (kodujący p60) i *hly* (kodujący LLO) [Jinneman i Hill, 2010]. Do każdej linii przyporządkowano odpowiadające jej serotypy [Davis i Mauer, 2011; Doumith i wsp., 2004; Shen i Higgins, 2005].

W roku 1989, szwedzki uczony Jean-Claude Piffaretti, po raz pierwszy dokonał podziału *L. monocytogenes* na linie filogenetyczne i przyporządkował im odpowiednie serotypy. Wyodrębnił on 2 linie (I i II) i przyporządkował serotypy następująco: linia I: 1/2b, 4b, 4a, linia II: 1/2c, 1/2a. Badania wielu innych badaczy doprowadziły do uzupełnienia podziału zaproponowanego przez Piffaretti o kolejną linię ewolucyjną – trzecią (tabela 2) [Davis i Mauer, 2011; Piffaretti i wsp., 1989]. Podział ten jest obecnie uważany za najbardziej poprawny, jednak istnieje jeszcze jeden, zaproponowany w 2004 r. Z wykorzystaniem metody multiplex PCR, Doumith i wsp. [2004], opracowali podział, który zakłada istnienie 5 grup serotypowych skorelowanych z odpowiednią linią filogenetyczną (tabela 3).

Tabela 2. Podział *L. monocytogenes* na grupy serotypowe w zależności od linii filogenetycznej

Linia filogenetyczna	I	II	III
Grupa serotypowa	(1/2b*; 3b; 7)	(1/2a*; 3a)	(4a; 4c)
	(4b*; 4d; 4e)	(1/2c; 3c)	

Tabela 3. Podział *L. monocytogenes* na 5 grup serotypowych zaproponowany przez Doumith i wsp. [2004]

Linia filogenetyczna	I	II	III
Grupa serotypowa	(1/2a* ; 3a)	(1/2b* ; 3b; 7)	(4a; 4c)
	(1/2c; 3c)	(4b* ; 4d; 4e)	

*W powyższych tabelach pogrubieniem zaznaczono serotypy najczęściej wywołujące listeriozę u ludzi.

Na przestrzeni ostatnich lat pojawiły się przesłanki do utworzenia kolejnej – IV linii filogenetycznej. Miałaby ona powstać w wyniku oddzielenia jednej z trzech podgrup grupy III (IIIA, IIIB i IIIC), wśród których IIIB znacznie wyróżnia się od pozostałych [Davis i Mauer, 2011; Shen i Higgis, 2013]. Poszczególne szczepy, w zależności od przynależności do grupy serotypowej mogą posiadać lub nie posiadać określonych genów wirulencji [Shen i Higgis, 2013].

Wszystkie serotypy *L. monocytogenes* są niebezpieczne dla człowieka, ale większość przypadków listeriozy powodowana jest przez serotypy 1/2a, 1/2b, 1/2c i 4b, które łącznie stanowią >98% izolatów *L. monocytogenes* izolowanych od pacjentów klinicznych w skali globu i są najczęściej wykrywanymi serotypami w żywności. Stwierdza się, że obecnie za większość wybuchów ognisk listeriozy odpowiedzialny jest serotyp 4b [Doumith i wsp. 2004; EFSA 2013; Lee i wsp. 2017; Liu i wsp. 2006; Zoz i wsp. 2017].

2.1.2. Geny charakterystyczne dla bakterii z gatunku *L. monocytogenes*

Pałeczki *L. monocytogenes* posiadają gen *rrs* kodujący 16S rRNA, za pośrednictwem którego odróżnia się je od innych rodzajów [Leclercq i wsp., 2010]. Innym elementem genomu bakterii jest występowanie klastra sześciu genów wirulencji, zwanego także wyspą patogenności *Listeria* LiPI-1 (ang. *Listeria Pathogenicity Island*) [Den Bakker i wsp., 2012; Graves i wsp., 2010]. Białka produkowane w wyniku ekspresji genów klastra umożliwiają bakteriom przeżycie wewnątrz komórek i przemieszczanie w obrębie tkanek [Den Bakker i wsp., 2010]. Klaster obejmuje następujące geny: *hly* – kodujący listeriolizynę (LLO) i warunkujący hemolityczność bakterii, *plcA* i *plcB* – kodujące fosfolipazy (PI-PLC i PC-PLC) i wspomagające bakterie w lizie błony wakuolarniej i ułatwiające bakteriom ucieczkę z fagosomu, *actA* – kodujący białko powierzchniowe ActA niezbędne w procesie nukleacji, białko pozwala na migrację bakterii do sąsiednich komórek dzięki ogonowi aktynowemu, *mpl* – kodujący metaloproteazę oraz gen *prfA* odpowiedzialny za wytworzenie białka PrfA, które jest czynnikiem regulacyjnym wszystkich genów klastra. Wyspę patogenności mają wszystkie patogenne szczepy *L. monocytogenes* (chorobotwórcze dla człowieka i zwierząt) [Milohanic i wsp., 2003; Jeyaletchumi

i wsp., 2001]. Innym genem warunkującym wirulencję i patogenność *L. monocytogenes* jest gen *iap* kodujący zewnątrzkomórkowe białko p60, które pełni rolę adhezyny i hydrolazy mureiny. Gen ten składa się z tandemu powtarzających się sekwencji (TRS): ACAAAT, który koduje dwa aminokwasy - treoninę i asparaginę, co wykorzystywane jest do wykrywania różnic pomiędzy szczepami *L. monocytogenes* [De Mello i wsp., 2008].

Kolejna grupa genów odpowiedzialna jest za kodowanie białek z rodziny internalin w zakażonych tkankach i charakterystyczne są one zarówno dla patogennych, jak i niepatogennych gatunków z rodzaju *Listeria*. Zalicza się do nich geny związane ze zdolnością do wirulencji np. *inlA* i *inlB* kodujące białka odpowiedzialne za inwazję komórek różnych typów [Den Bakker i wsp., 2010; Shen i wsp., 2013].

2.1.3. Mechanizmy wirulencji

L. monocytogenes zdolna jest do pokonywania trzech głównych barier w ludzkim organizmie: bariery jelitowej, bariery łożyskowej i bariery krew – mózg, w związku z czym bakteria ta wnika to różnego typu komórek nefagocytujących i przemieszcza się w tkankach [Vázquez-Boland i wsp., 2001]. W przypadku spożycia żywności skażonej *L. monocytogenes* niskie pH żołądka nie stanowi zagrożenia dla przeżywalności bakterii, która jest odporna na działanie niesprzyjających warunków środowiskowych (w tym niskiego pH), za pośrednictwem genów *sigB*, *opuCA*, *lmo1421* i *bsh*, i kodowanych przez nich białek. W kolejnym etapie infekcji bakteria wnika do komórek żywiciela w sposób bierny za pośrednictwem procesu fagocytozy lub w sposób czynny, poprzez działanie internalin – białek powierzchniowych, tj. internaliny A (InlA), internaliny B (InlB), internaliny C (InlC) i internaliny J (InlJ), a następnie zamykana jest w pęcherzyku fagocytarnym, z którego wydostaje się i przenika do cytoplazmy [Liu i wsp., 2006; Shen i wsp., 2013]. *L. monocytogenes* zdolna jest również do swobodnego poruszania się w obrębie organizmu gospodarza, co umożliwia jej obecność białka powierzchniowego ActA, odpowiedzialnego za zdolność ruchu (tabela 4) [Liu i wsp., 2006].

Kolejnym czynnikiem wirulencji *L. monocytogenes* jest występowanie peptydu hemolitycznego – listeriolizyny S (LLS), który odgrywa rolę w przeżywalności komórek bakteryjnych, ponieważ warunkuje odporność względem granulocytów obojętnochłonnych [Cotter i wsp., 2008]. Obecność LLS wpływa na zdolność bakterii do przedostawania się z fagosomu lub makrofagu, co może stanowić kluczowy element w patogenności bakterii. Należy jednak podkreślić, że LLS nie występuje tak powszechnie jak LLO i ogranicza się do I linii filogenetycznej [Clayton i wsp. 2011].

Badania przeprowadzone na przestrzeni wielu lat pozwalają na wnioskowanie, że odpowiednie serotypy różnicują bakterie pod względem genów zjadliwości. Najmniej zjadliwe są szczepy należące do III linii

filogenetycznej, które wyróżniają się brakiem genów *inIJ*, *inIC*, *iap* czy LLS. Obecność lub brak poszczególnych genów odpowiada za zjadliwość poszczególnych bakterii, nawet jeśli należą one do potencjalnie chorobotwórczego gatunku *L. monocytogenes* [Liu i wsp., 2007; Shen i wsp., 2013].

Tabela 4. Geny wirulencji *L. monocytogenes*, kodowane białko i jego funkcja [Liu i wsp. 2007; Gliński i Kostro, 2012; MOH, 2018; Muskalska i Szymczak, 2015]

Gen	Białko	Funkcja kodowanego białka
<i>ami</i>	Ami	Warunkowanie polimeryzacji włókien aktynowych
<i>bsh</i>	BSH	Zapewnienie przetrwania bakterii w środowisku niskiego pH (umożliwienie inwazji jelita).
<i>clpC</i>	ClpC	Wpływ na ekspresję <i>inIA</i> , <i>inIB</i> i <i>actA</i> oraz modyfikację ekspresji <i>hlyA</i> . Kierowanie białek do degradacji za pośrednictwem proteazy ClpP.
<i>clpE</i>	ClpE	Kierowanie białek do degradacji za pośrednictwem proteazy ClpP.
<i>clpP</i>	ClpP	Zapewnienie odporności bakterii na wysoką temperaturę.
<i>fbpA</i>	FbpA	Regulacja ekspresji <i>inIB</i> i <i>hlyA</i> oraz zapobieganie rozpoznania patogenu przez system immunologiczny gospodarza.
<i>hpt</i>	Hpt	Adaptacja do wzrostu w cytozolu.
<i>iap</i>	P60	Umożliwienie adhezji komórek bakteryjnych do komórek gospodarza oraz zapewnia prawidłowy podział komórkowy.
<i>inIA</i>	inIA	Oddziaływanie białka z E-kadheryną prowadzi do rearanżacji cytoszkieletu i fagocytozy poprzez internalizację do komórek nabłonka jelit.
<i>inIB</i>	inIB	Umożliwienie internalizacji hepatocytów, fibroblastów i komórek nabłonka.
<i>inIC</i>	inIC	Umożliwienie pozajelitowych stadiów zakażenia.
<i>llsA</i> , <i>llsB</i> , <i>llsD</i> , <i>llsG</i> , <i>llsH</i> , <i>llsP</i> , <i>llsX</i> , <i>llsY</i>	LLS	Zapewnienie oporności względem granulocytów obojętnochłonnych.
<i>hlyA</i>	LLO	Umożliwienie przejścia z fagosomu do cytoplazmy za pośrednictwem lizy błony pęcherzyka fagocytarnego.
<i>plcA</i> <i>plcB</i>	PlcA PlcB	Wspomaganie lizy błony pęcherzyka fagocytarnego.
<i>mpl</i>	mpl	Aktywacja białka plcB.
<i>atcA</i>	ActA	Umożliwienie migracji komórek bakteryjnych w obrębie organizmu gospodarza.
<i>prfA</i>	PrfA	Aktywacja transkrypcji genów LiPI-1.

2.1.4. Chorobotwórczość *L. monocytogenes*

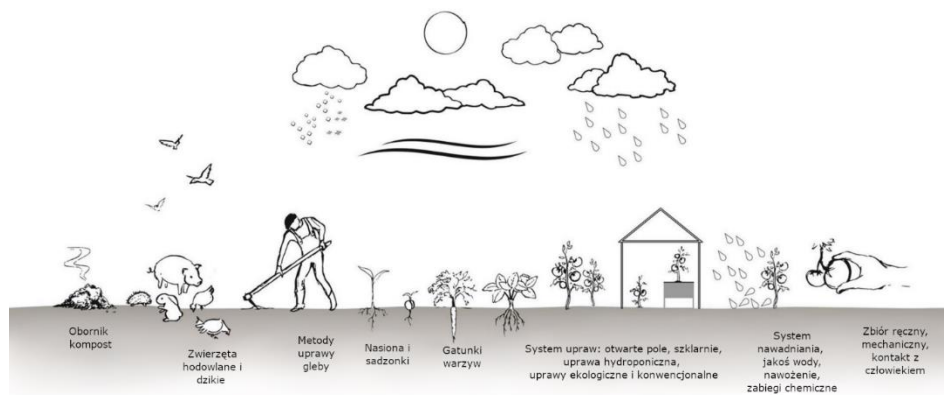
Bakterie *L. monocytogenes* mogą poprzez spożycie skażonej żywności czy wody wywołać chorobę zwaną listeriozą [Kastbjerg i Gram, 2012]. Choroba ta stanowi zagrożenie zarówno dla osób zdrowych (20%), jak i osób z grupy podwyższonego ryzyka, tzn. YOPI (ang. *Young, Old, Pregnant, Immunocompromised*), do której zalicza się osoby starsze, z osłabioną odpowiedzią immunologiczną, po przeszczepach, kobiety w ciąży, alergików, diabetyków, dzieci, niemowlęta i noworodki [Jeylatchumi i wsp., 2010; Kramarenko i wsp., 2013 Malinois i wsp., 2005; Todd i Notermans, 2011; Walczycka, 2005]. W zależności od ogólnego stanu zdrowia przebieg listeriozy może mieć ostrzejszy lub łagodniejszy charakter. W przypadku osób dorosłych, zdrowych listerioza daje objawy grypopodobne oraz przypominające postać jelitową [Molenda, 2009]. Istotne zagrożenie dla życia pojawia się, gdy choroba przyjmuje postać bakteriemii czy zapalenia opon mózgowych [Malinois i wsp., 2005].

Na szczególnie ciężki przebieg choroby szczególnie narażone są osoby chorujące na nowotwory, cukrzycę, HIV/AIDS, choroby wątroby czy będących po przeszczepie, które objawia się wystąpieniem posocznicy, zapalenia opon mózgowych oraz niebezpiecznych infekcji centralnego układu nerwowego [Todd i Notermans, 2011]. W przypadku kobiet w ciąży istnieje wysokie ryzyko poronienia, jeśli dojdzie do zakażenia *L. monocytogenes* [Esteban i wsp., 2009; Pinto i wsp., 2010]. Noworodki zainfekowane tą bakterią chorują na zapalenie płuc, sepsę i zapalenie opon mózgowych.

U zwierząt listerioza wywoływana jest przez *L. monocytogenes* i (rzadziej *L. ivanovii*) [Todd i Notermans, 2011]. Szczególnie narażone na wystąpienie choroby są kozy, owce i bydło, które zostają zainfekowane za pośrednictwem skażonej paszy (kiszzonek). Choroba ta objawia się m.in. zapaleniem łożyska i macicy i jest bezpośrednią przyczyną poronień i śmierci płodu. Nowonarodzone zwierzęta, które przeżyły okres płodowy stają się nosicielami patogenu. W przypadku trzody chlewnej do zakażenia dochodzi drogą oddechową, pokarmową czy przez spojówki oczu, natomiast choroba objawia się posocznicą czy postacią nerwową, ale może również nie dawać żadnych objawów. Na infekcję narażone są również koty, psy, drób, ptaki, ryby, owady, kleszcze, skorupiaki i ostrygi, a jej wystąpienie w Polsce podlega obowiązkowemu zgłoszeniu [Gliński i Kostro, 2012].

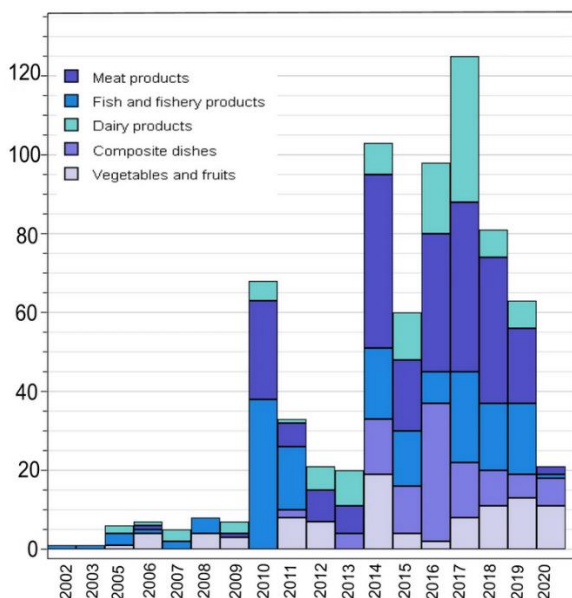
2.2. WYSTĘPOWANIE *L. MONOCYTOGENES* W ŚRODOWISKU I ŻYWNOŚCI

Na każdym etapie produkcji, począwszy od surowca, poprzez linie technologiczne, aż do gotowego produktu dąży się do ograniczenia ryzyka mikrobiologicznego skażenia, jednak nie jest możliwa jego zupełna eliminacja [Nowicka i wsp., 2014]. *L. monocytogenes*, obecna w surowcach, pochodzi przede wszystkim z gleby lub skażonej wody. Hodowcy zwierząt gospodarskich często sami wytwarzają pasze dla hodowanych przez siebie zwierząt. Wytwarzanie pasz polega na komponowaniu mieszanek, zawierających niezbędne dla danego gatunku i grupy technologicznej zwierzęcia składniki odżywcze, sporządzanych z wykorzystaniem dostępnych w gospodarstwie komponentów zbożowych, białkowych i innych. Wówczas istnieje ryzyko skażenia pasz przez *L. monocytogenes*, z uwagi na jej powszechne występowanie we wodzie i glebie. Zwierzę po spożyciu takiej paszy staje się rezerwuarem bakterii i poprzez wydalane przez siebie odchody (które następnie wykorzystywane są jako nawozy naturalne) przyczyniają się do dalszego rozprzestrzeniania patogenu w środowisku. Wykorzystanie skażonych ziaren lub sadzonek również zwiększa ryzyko kontaminacji surowców roślinnych. Do mikroorganizmów najczęściej izolowanych z gleby zalicza się: pałeczki *Salmonella*, *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*, *Clostridium botulinum* i *L. monocytogenes* [Chmiel i Frączek, 2016; Smith i wsp., 2018]. Istotnym czynnikiem wpływającym na skażenie roślin uprawnych patogenami jest sposób uprawy. Ekologiczne metody uprawy stanowią zagrożenie dla bezpieczeństwa mikrobiologicznego surowców, ponieważ ze względu na warunki tego typu upraw (m.in. ograniczenie w stosowaniu chemicznych środków ochrony roślin i nawożenia mineralnego) są one narażone na czynniki takie jak styczność z osobami bezpośrednio pracującymi przy uprawie, zastosowaniem nawozów naturalnych, wiatr, deszcz czy wędrówki dzikich zwierząt, które stanowią potencjalne wektory dla *L. monocytogenes* [Miceli i Setani, 2019]. *L. monocytogenes* jest drobnoustrojem szeroko rozpowszechnionym w środowisku, dlatego też może łatwo przenikać do otoczenia produkcyjnego żywności i pasz dla zwierząt [Kowalik i wsp., 2014; Melo i wsp., 2015; Muhterem i wsp., 2015; Saludes i wsp., 2015]. Skażenie, będące przyczyną listeriozy najczęściej dotyczy żywności niewymagającej przetworzenia (RTE, rysunek 2). Wyniki badań, prowadzonych na przestrzeni wielu lat dowodzą, że skażenia żywności *L. monocytogenes* dotyczyły również surowego mięsa, ryb surowych i wędzonych, owoców morza, niepasteryzowanego mleka, serów miękkich dojrzewających, śmietany, warzyw i owoców, a nawet produktów mrożonych, pochodzenia zwierzęcego i roślinnego, a ich geneza ma zróżnicowane podłoże (rysunek 1) [Jemmi Stephan, 2006; Micelli i Setani 2019].



Rys. 1. Czynniki wpływające na skażenie surowców roślinnych *L. monocytogenes* [Miceli i Setani, 2019]

W latach 2010-2014 przeprowadzono badania nad skażeniami mikrobiologicznymi buraka ćwikłowego, sałaty, kolb kukurydzy, rzodkiewki i korzeni marchwi. Warzywa pozyskane zostały z gospodarstw ekologicznych i konwencjonalnych na terenie całej Polski. Łącznie zgromadzono i przeanalizowano próbki 800 warzyw, które badano pod kątem skażenia różnymi mikroorganizmami, m.in. *Escherichia coli* i *L. monocytogenes*. Potwierdzono skażenia w 85 gospodarstwach certyfikowanych ekologicznych i 97 tradycyjnych. Biorąc pod uwagę nawożenie stwierdzono, że źródłem zakażeń tymi bakteriami jest nawóz naturalny, który stosowany w przypadku obu rodzajów gospodarstw [Szczech i wsp., 2014].



Rys. 2. Przypadki skażenia produktów mięsnych, ryb i produktów rybnych, nabiału, artykułów spożywczych złożonych, warzyw i owoców w latach 2002 – 2020 w krajach Europejskich [źródło: Félix i wsp., 2022]

Podczas produkcji żywności kluczowymi elementami są jakość, czystość mikrobiologiczna oraz warunki przechowalnicze. Szczególnie narażone na skażenie patogennymi mikroorganizmami są produkty pochodzenia zwierzęcego, jednak istnieje również istotne niebezpieczeństwo skażenia produktów pochodzenia roślinnego. Na ryzyko to wpływają różne czynniki. Źródłem zanieczyszczenia jest najczęściej obornik, który wykorzystywany jest przez rolników do nawożenia gleby, zwierzęta (w tym dzikie) obecne na polach uprawnych, a także pracownicy zakładów produkcyjnych. Na przestrzeni ostatnich lat zanotowano wzrost zakażeń spowodowanych spożyciem świeżych warzyw. Obserwuje się również znaczący wzrost zainteresowania konsumentów zdrowym odżywianiem, a tym samym wzrost popularności gospodarstw ekologicznych, gdzie wykorzystywane są wyłącznie nawozy naturalne. Ich stosowanie może wpływać na skażenie bakterią *L. monocytogenes* nie tylko warzyw uprawianych na danym polu, ale wód powierzchniowych. Kolejnym zagrożeniem dla bezpieczeństwa żywności jest nieodpowiedni proces produkcyjny, ponieważ zarówno na etapie wytwarzania, jak również na etapie przechowywania, nieodpowiedni stan higieniczny może prowadzić do zanieczyszczeń [Jaroszewska i wsp., 2014].

Szczególną grupą produktów, w których możliwe jest występowanie *L. monocytogenes* jest żywność minimalnie przetworzona, czyli taka, której skład chemiczny i cechy sensoryczne nie odbiegają od surowca, z którego powstała [Nowicka i wsp., 2014]. Zalicza się do niej przede wszystkim

świeże owoce i warzywa (WOMP, *Warzywa i Owoce Minimalnie Przetworzone*). Na terenie Unii Europejskiej produkuje się około 300 - 400 rodzajów minimalnie przetworzonych owoców i warzyw, m. in.: przekąski warzywne (w tym całe lub rozdrobnione warzywa), sałatki warzywne, owoce do koktajli (kostkowane, mrożone ananasy, brzoskwinie) czy sałatki owocowe. Z uwagi na konieczność zachowania przez produkt wysokiej wartości odżywczej oraz estetycznego wyglądu (w tym intensywnego koloru) surowce poddawane są łagodnym metodom obróbki i utrwalania, do których zalicza się m. in. sortowanie, mycie i dezynfekcję, osuszanie, obieranie, rozdrabnianie, cięcie, siekanie, pakowanie i przechowywanie. Przy zachowaniu odpowiednich warunków pakowania i przechowywania produkty zachowują trwałość przez dłuższy czas. Zakres temperatur od 0 do 7°C, panujących w przechowalniach, spowalnia procesy zachodzące w produktach, powodujące ich starzenie się i psucie [Nowicka i wsp., 2014; Sant'Anna i wsp., 2020]. Z uwagi na brak zastosowania metod utrwalania żywności przy użyciu wysokich temperatur, żywność minimalnie przetworzona jest szczególnie narażona na szkodliwe działanie czynników biologicznych. Realne zagrożenie, jakie stanowi *L. monocytogenes*, stało się powodem opracowania przez Komisję Europejską wymagań dot. żywności gotowej do spożycia. Zakładają one, że liczba bakterii z gatunku *L. monocytogenes*, obecna w żywności zdanej do spożycia i pozostającej w obrocie, nie może przekraczać 100 jtk/g. W przypadku żywności przeznaczonej dla niemowląt i specjalnego przeznaczenia medycznego wymaga się, aby bakterie nie były obecne w 25 g produktu. To samo w przypadku produktów, w których możliwy jest wzrost tej bakterii.

Szeroki zakres tolerancji temperatur i pH oraz zdolność do tworzenia biofilmu umożliwiają *L. monocytogenes* rozprzestrzenianie się w środowisku produkcyjnym, adaptację do zmiennych warunków i kolonizację różnych elementów wyposażenia hali produkcyjnej [Lundén i wsp., 2000]. *L. monocytogenes* bytują najczęściej w miejscach trudnych do czyszczenia, takich jak np. wnętrza maszyn lub ostrza krajalnic. W przypadku nieskutecznych procedur mycia i dezynfekcji bakterie mogą rozprzestrzenić się do produktów za pośrednictwem surowców lub odzieży ochronnej.

2.2.1. Biofilm *L. monocytogenes* jako zagrożenie w zakładach produkcji i przetwarzania żywności

Biofilm (błona biologiczna) jest przestrzenną strukturą wielokomórkową utworzoną przez mikroorganizmy tego samego lub kilku gatunków, które wykazują zdolność do przylegania do siebie nawzajem i do powierzchni stałych (biotycznych i abiotycznych), otoczone warstwą wytworzonych przez siebie zewnątrzkomórkowych polimerów [Czaczyk i Wojciechowska, 2003]. Badanie natury, powstawania, wykrywania i eliminacji biofilmów ma ogromne znaczenie ze względu na ich znaczący wpływ

jako czynnika ryzyka wystąpienia ognisk chorób odżywnościowych. Skażenie żywności za pośrednictwem biofilmu nazywa się zanieczyszczeniem krzyżowym, ponieważ biofilm jest źródłem skażenia żywności, natomiast skażona żywność jest źródłem rozprzestrzeniania się bakterii na pozostałe elementy linii produkcyjnej. Na szczególną uwagę zasługuje sprzęt, taki jak krajalnice i młynki, deski do krojenia, noże i stoły, które zostały zidentyfikowane jako najbardziej narażone na powstawanie biofilmów bakteryjnych [Mazaheri i wsp., 2021]. W pełni rozwinięty biofilm składa się w 60% z wody [Chmielewski i Frank, 2006; Ploux i wsp., 2007]. Głównym komponentem biofilmu bakteryjnego są pozakomórkowe substancje wytwarzane przez mikroorganizmy, tzw. EPS (ang. *Extracellular Polymeric Substances*), które zdolne są do wchłaniania wody oraz wychwytywania zawartych w niej substancji odżywczych. Należą do nich białka, w tym enzymy, zewnątrzkomórkowe cząsteczki DNA, RNA oraz polisacharydy [Colagiorgi i wsp., 2017; Jamal i wsp., 2015; Kostakioti i wsp., 2013]. EPS pełni funkcję stabilizującą i scalającą komórki, poza tym chroni komórki przed negatywnym oddziaływaniem środowiska zewnętrznego (np. chłodzeniem, zakwaszaniem, zasoleniem czy dezynfekcją) [Baker i wsp., 2010]. Ilość EPS, wydzielona przez drobnoustroje, zależy od ilości i składu przyswajanych przez nie substancji odżywczych. Czynnikiem stymulującym wytwarzanie EPS jest obecność łatwo przyswajalnego węgla przy jednoczesnej, obniżonej zawartości fosforanów, azotu i potasu.

Biofilm *L. monocytogenes*, szczególnie ten powstający na powierzchniach mających kontakt z żywnością, został zidentyfikowany jako istotny wektor zanieczyszczenia żywności [Bremer i wsp., 2001; Carpentier i Chassaing, 2004; Ayebah i wsp., 2005; Amalaradjou i wsp. 2009]. Wskazano również, że patogeny znacznie częściej tworzą biofilmy heterogenne, np. z *Pseudomonas* spp. lub *L. innocua* [Carpentier i Chassaing, 2004]. Powstawanie biofilmu jest uzależnione od wielu czynników, a jego genetyczne mechanizmy nie zostały do końca wyjaśnione [Jamal i wsp., 2015; Kostakioti i wsp., 2013]. Wiadomo jednak, że w jego formowaniu bierze udział ponad 650 genów odpowiadających za kodowanie różnych cech bakterii [Zetzmann i wsp., 2016]. Przykładowo: gen *prfA*, odpowiedzialny za kodowanie czynników wirulencji, jest promotorem wytwarzania biofilmu i reguluje co najmniej 185 innych genów związanych z tym procesem. Pałeczki *L. monocytogenes* zdolne są do wytwarzania biofilmu w różnych zakresach temperatur i na różnych powierzchniach, przy czym powierzchnie chropowate są łatwiej kolonizowane przed drobnoustroje. Zdolność ruchu sprzyja procesom adhezji komórek bakteryjnych [Jamal i wsp., 2015]. Zdolność formowania biofilmu przez *L. monocytogenes* oraz jego struktura przestrzenna zależą również od linii ewolucyjnej, do której należy dany szczep [Colagiorgi i wsp., 2017].

2.2.2. Skazenia żywności w Polsce wywołane przez *L. monocytogenes*

Spożycie żywności zawierającej powyżej 10^3 komórek *L. monocytogenes* w 1g jest niebezpieczne dla zdrowia człowieka, w związku z czym w wielu krajach wprowadzono zasadę „zero tolerancji” dla obecności *L. monocytogenes* w żywności. W roku 2006 zgłoszono najwięcej przypadków listeriozy w krajach Europy – większość zgłoszonych przypadków miała miejsce w Niemczech, Francji i Wielkiej Brytanii. Najmniej przypadków zgłaszano w państwach, które przystąpiły do Unii Europejskiej w 2004 roku. Różnica w liczbie zgłoszeń mogła wynikać z problemów w poszukiwaniu danych, nie natomiast z mniejszej zachorowalności. W ostatnich latach liczba zakażeń na listeriozę, będącą skutkiem spożycia żywności skażonej *L. monocytogenes*, sukcesywnie rośnie (tabela 5) [Galińska i wsp., 2010; NIZP – PZH, 2018; SAID, 2018]. Wzrost zainteresowania konsumentów żywnością typu RTE oraz niewłaściwe przygotowanie żywności lub przechowywanie jej niezgodnie z zaleceniami przyczyniają się do corocznego przyrostu zachorowań. Podniesienie poziomu świadomości społeczeństwa o istotności bezpieczeństwa żywności, ulepszone systemy wykrywania i odnotowywania infekcji również wpływają na skuteczność wykrywania zakażeń.

Tabela 5. Liczba zachorowań na listeriozę w latach od 2009 do 2019 oraz procent hospitalizacji [Czarkowski i wsp., 2020]

Rok	Liczba zachorowań	Procent hospitalizacji
2009	33	100
2010	64	96,9
2011	64	100
2012	54	100
2013	54	94,4
2014	83	96,4
2015	69	100
2016	98	99
2017	116	97,4
2018	128	99,2
2019	121	97,5

W Polsce odnotowano wystąpienie dwóch epidemii listeriozy, które przypadały na lata 2000 oraz 2013 - 2018. Przyczyną pierwszej z nich były skażone pasztety, co skutkowało zainfekowaniem 10 osób. W latach od 2013 do 2018 Główny Inspektorat Sanitarny wystosował sześć ostrzeżeń, które dotyczyły skażeń kolejno: przetwory mleczne (listopad 2013 i marzec 2014), parówki (czerwiec 2018), wędliny, warzywa i twaróg (lipiec 2018) [GIS, 2013; GIS, 2014; GIS 14.06.2018; GIS, 3.07.2018; GIS, 9.07.2018; GIS, 23.07.2018; GIS, 31.07.2018; Greenyard Frozen Poland, 13.07.2018; Olewnik-Mikołajewska, 2.07.2018].

2.2.3. Metody ograniczania rozwoju *L. monocytogenes* w żywności pochodzenia roślinnego

Jednym z wielu czynników wpływających zagrożenie bezpieczeństwa żywności jest globalizacja gospodarki, która stwarza ryzyko zakażeń żywności nieznanymi dotąd rodzajami drobnoustrojów oraz wymusza na producentach zwiększenie produkcji. Bezpieczeństwo produktu spożywczego musi być zapewnione w całym cyklu produkcyjnym od surowca do momentu spożycia [Kowalska, 2010]. Istnieje wiele systemów zarządzania jakością i bezpieczeństwem żywności, które dotyczą kontroli żywności na wszystkich jej etapach i dały podwaliny normy ISO 22000. Należą do nich m.in.: Dobra Praktyka Rolnicza (ang. GAP – *Good Agricultural Practice*), Dobra Praktyka Wytwarzania (ang. GMP – *Good Manufacturing Practice*), Dobra Praktyka Higieniczna (ang. GHP – *Good Hygienic Practice*), system HACCP (ang. *Hazard Analysis and Critical Control Point*) czy norma ISO 9001 [Kijowski i Sikora, 2003].

ISO 22000 zakłada nadzór surowców oraz środowiska produkcji żywności na każdym etapie jej wytwarzania, z uwagi na ryzyko wystąpienia skażenia w każdym z ogniw łańcucha żywieniowego i daje możliwość zarządzania bezpieczeństwem żywności przy użyciu środków nadzoru, tzn. dobrych praktyk postępowania, norm i systemu HACCP.

2.2.3.1. Dezynfektanty

Ryzyko skażenia żywności minimalnie przetworzonej jest znacznie większe niż w przypadku produktów wysoko przetworzonych. Produkty minimalnie przetworzone zachowują cechy zbliżone do surowców pierwotnych, jednak nadal muszą spełniać zasady bezpieczeństwa żywności, tzn. aby poziom zanieczyszczenia drobnoustrojami był poniżej dopuszczalnej wartości, a przydatność do spożycia nie krótsza niż 4 dni. Dezynfekcja jest szczególnie istotna w zakładach, w których mokre powierzchnie zapewniają korzystne warunki dla rozwoju drobnoustrojów. Wybór detergentów i środków dezynfekujących w przemyśle spożywczym zależy od skuteczności, bezpieczeństwa i splukiwalności środka, a także od tego, czy wpływa on na wartości sensoryczne wytwarzanych produktów. Zastosowanie skutecznych środków dezynfekujących minimalizuje zanieczyszczenie produktu, wydłuża okres przydatności do spożycia i zmniejsza ryzyko chorób przenoszonych przez żywność. Środki dezynfekcyjne zatwierdzone do stosowania w przemyśle spożywczym to głównie alkohole, utleniacze, związki na bazie jodoforów, na bazie chloru, nadsiarczany, surfaktanty i czwartorzędowe związki amoniowe [Wirtanen i Salo, 2003]. Dużą popularnością w zakładach przetwórstwa owocowo-warzywnego cieszą

się alkaliczne środki na bazie aktywnego chloru oraz środki o wysokiej zawartości etanolu (pow. 70%). Należą do nich takie środki jak Deptal CMC, Deptil HDS, Tesol czy Tesol M. Ze względu na wytwarzanie piany po kontakcie z wodą środki te są szczególnie pożądane przez przetwórców, ponieważ pozwalają na dokładną i precyzyjną dezynfekcję. W przypadku środków o odczynie kwaśnym (np. Alusol, Oxonia Active) znajdują one zastosowanie w zwalczaniu zanieczyszczeń tłuszczowych, białkowych i osadów z kamienia i rdzy.

Stosowanie odpowiednich dezynfektantów jest kluczowe dla eliminacji zagrożenia, jakie stanowi *L. monocytogenes* [Bortolussi, 2008; Hernandez-Milian i Payeras-Cifre, 2014]. W zakładach przetwórczych mycie i dezynfekcja warzyw i owoców gotowych do spożycia lub przeznaczonych produkcji żywności minimalnie przetworzonej jest najczęściej jedynym etapem, w którym możliwa jest redukcja patogennych drobnoustrojów. Stosowany środek dezynfekcyjny nie powinien przede wszystkim powodować zmian sensorycznych w produkcie [Gómez-López i wsp., 2007; Rahman i wsp., 2013]. Najczęściej stosowanymi środkami dezynfekcyjnymi w przemyśle owocowo-warzywnym są substancje zawierające chlor, z uwagi na ich przystępną cenę, wysoką skuteczność, rozpuszczalność w wodzie, obojętność dla zdrowia ludzi, środowiska i jakości sensorycznej warzyw i owoców [São José i Vanetti, 2015]. Substancjami powszechnie stosowanymi w dezynfekcji owoców i warzyw są: podchloryn sodu, kwaśny chloryn sodu, dwutlenek chloru, nadtlenek wodoru, kwas nadoctowy, woda elektrolizowana i ozon. Na skuteczność procesu dezynfekcji wpływa także struktura i rodzaj powierzchni surowca. Warzywa o gładziej powierzchni i luźniejszej strukturze komórkowej (np. pomidor) są bardziej podatne na środki dezynfekcyjne niż warzywa twarde, posiadające pory i bruzdy, które stanowią swego rodzaju nisze dla wszelkiego rodzaju drobnoustrojów (np. marchew, brokuł) [Kwong i wsp., 2015; Bermúdez-Aguirre i Barbosa-Cánovas, 2013].

2.2.3.2. Biokonserwanty ograniczające występowanie w *L. monocytogenes* w warzywach i owocach minimalnie przetworzonych (WOMP)

W celu poprawy trwałości WOMP poszukuje się nowych i skutecznych metod nietermicznego utrwalania. Odpowiednio dobrane parametry tych procesów gwarantują stabilność mikrobiologiczną produktów oraz zachowanie ich wyjściowych cech sensorycznych. Wśród nich należy wymienić aktywne pakowanie, promieniowanie UV, wysokie ciśnienie hydrostatyczne, ozonowanie czy naturalne dodatki przeciwdrobnoustrojowe, które poprawiają jakość mikrobiologiczną i sensoryczną WOMP [Iturralde-García i wsp., 2022].

Szczególną grupą środków naturalnych są biokonserwanty, do których należą np.: bakteriocynty, lizozym czy bakteriofagi.

Bakteriocynty

Bakteriocynty to metabolity białkowe o działaniu przeciwdrobnoustrojowym wytwarzane przez bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne. Charakteryzują się zróżnicowanymi właściwościami biochemicznymi, mechanizmami działania, spektrum aktywności oraz lokalizacją i sekwencją genu kodującego aktywne białko. Bakteriocynty to substancje biobójcze w stosunku do mikroorganizmów należących do innych rodzajów niż producent danej bakteriocynty, w tym również wobec takich patogenów jak *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* czy *Clostridium* spp. [de Arauz i wsp., 2009]. Bakteriocynty są łatwo rozkładane przez enzymy proteolityczne ssaków. Stanowią swoistą grupę toksyn wobec blisko spokrewnionych szczepów bakteryjnych, które pomimo że pod wieloma względami przypominają antybiotyki nimi nie są. W przeciwieństwie od antybiotyków charakteryzują się one większą tolerancją na wysoką temperaturę, a ich aktywność nie jest zależna od pH środowiska. Ze względu na specyfikę działania, ich budowę oraz strukturę nabywanie oporności bakterii na działanie bakteriocyntów jest znacznie trudniejsze. Bakteriocynty wykazują również znacznie węższe, bardziej specyficzne spektrum działania niż antybiotyki [Cleverland i wsp., 2001; De Arauz i wsp., 2009; Tomaszewska i wsp., 2014; Błaszczuk i wsp., 2017; Ołdak i Zielińska, 2017; Szafrńska i Solowej, 2018].

Bakteriocynty, które produkowane są przez bakterie gramdodatnie, dzielą się na cztery klasy:

Klasa I: lantyny; nizyna, subtilina, marsacydyna, laktacyna,

Klasa II: bakteriocynty niantyny,

Klasa III: bakteriocynty wysokocząsteczkowe,

Klasa IV: kompleksy białkowo-lipidowe i białkowo-węglowodanowe.

Do pierwszej klasy zalicza się peptydy, w skład których wchodzi policykliczne aminokwasy tioeterowe (np. lationina, metylationina) i nienasycone aminokwasy (np. dehydroalanina i kwas 2-aminomasłowy) [Ołdak i Zielińska, 2017; Szafrńska i Solowej, 2018]. Należą do nich cząsteczki typu A i typu B. Mechanizm działania cząsteczek A opiera się na wytworzeniu por w błonie komórkowej bakterii, podczas gdy cząsteczki typu B zakłócają biosyntezę błony komórkowej lub reakcje enzymatyczne komórki [Cleverland i wsp., 2001; Tomaszewska i wsp., 2014; Ołdak i Zielińska, 2017; Szafrńska i Solowej, 2018]. Bakteriocynty drugiej klasy stanowią cząsteczki nie przekraczające 10 kDa, które nie zawierają w swojej cząsteczce lantoniny i można je podzielić na cztery podklasy: IIa (bakteriocynty pediocynopodobne), IIb (bakteriocynty dwuskładnikowe, np. laktocyny F i G i laktokokcyny), IIc (cząsteczki o budowie kołowej, odporne na działanie proteaz, skuteczne wobec

Listeria spp.) oraz IId (liniowe bakteriocyny niemodyfikowane posttranslacyjnie) i Solowej [Ołdak i Zielińska, 2017; Szafrąńska, 2018; Tomaszewska i wsp., 2014]. Klasa trzecia bakteriocyn to związki najmniej poznane, a należą do niej termostabilne peptydy o masie >30 kDa, których przykładem jest helevetycyna [Tomaszewska i wsp., 2014; Cavera i wsp., 2015; Ołdak i Zielińska, 2017].

Mechanizmy oddziaływania bakteriocyn na komórki bakteryjne są zróżnicowane i zależą od rodzaju i pochodzenia substancji. Opierają się na zakłócaniu biosyntezy peptydoglikanu, hamowaniu biosyntezy białek, zaburzaniu przebiegu replikacji DNA, zaburzaniu transkrypcji czy przerywaniu ciągłości błony komórkowej [Cavera i wsp., 2015]. Niektóre bakteriocyny wykazują synergizm w połączeniu z innymi substancjami przeciwdrobnoustrojowymi, w tym również chemicznymi konserwantami, związkami fenolowymi czy innymi, naturalnymi białkami o działaniu antymikrobiologicznym [Franklin i wsp., 2004; Sant'Anna i wsp., 2020], a ich skuteczność zależy od wielu czynników, takich jak: pH, temperatura, skład żywności, opady czy inaktywacja lub nierównomierne rozmieszczenie bakteriocyny [Grisi i Gorlach-Lira, 2005].

Bakteriocyną powszechnie stosowaną w ochronie żywności jest nizyna, polipeptyd wytwarzany przez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* [Sant'Anna i wsp., 2013]. FDA (ang. *Food and Drug Administration*) w 1988 roku nadała jej status substancji GRAS (ang. *Generally Recognized as Safe*), stąd duże zainteresowanie tym związkiem jako biokonserwantem [Franklin i wsp., 2004]. Wykazuje on szerokie spektrum antymikrobiologiczne przeciwko bakteriom takich rodzajów jak: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Brochotrix*, *Enterococcus*, *Listeria* i *Mycobacterium* oraz w stosunku do przetrwalników i komórek wegetatywnych bakterii z rodzaju *Clostridium* i *Bacillus* [De Arauz i wsp., 2009]. Występuje w postaci krystalicznej, a najwyższą aktywność wykazuje w niskim pH. Nizyna rozpuszcza się w rozpuszczalnikach polarnych, a jej rozpuszczalność rośnie wraz ze wzrostem temperatury i maleje ze wzrostem pH (tabela 6).

Tabela 6. Rozpuszczalność i aktywność nizyny w rozpuszczalnikach polarnych

Rozpuszczalnik	Rozpuszczalność (mg/ml)	Aktywność (IU/ml)
Woda destylowana (pH 5,9)	50	2,0*10 ⁶
Woda wodociągowa (pH 7,1)	49	1,96*10 ⁶
Roztwór HCl (0,02M)	118	4,72*10 ⁶
Roztwór NaCl 2%	47,9	1,91*10 ⁶
Odtłuszczone mleko	87,5	3,5*10 ⁶

Wśród istotnych cech nizyny wymienić należy brak wpływu na mikrobiom jelitowy, ponieważ ulega ona rozkładowi przez proteiny, co czyni ją bezpieczną dla ludzi [Tomaszewska i wsp., 2014; Ołdak i Zielińska, 2017; Szafrńska i Solowej, 2018].

Mechanizm działania nizyny polega na wytworzeniu por w błonie komórkowej komórek bakteryjnych, poprzez jej łączenie z lipidem II, prekursorem peptydoglikanu [Tomaszewska i wsp., 2014; Ołdak i Zielińska, 2017]. Obecnie poznano wiele wariantów nizyny zarówno tych wyizolowanych ze środowiska, jak i tych, które stworzone zostały przez człowieka. Ze środowiska naturalnego wyizolowano warianty: A, Z, F, Q, H, U, U2 i P. Celem poprawy stabilności i skuteczności nizyny oraz modyfikacji jej farmakologicznych właściwości, przy użyciu metod bioinżynieryjnych, powstało wiele odmian nizyny, takich jak A K22T, A N20P, A M21V, A K22S czy S29A [Shin i wsp., 2016].

W przypadku *L. monocytogenes* obserwuje się działanie antybakteryjne nizyny, szczególnie jeżeli została ona zastosowana w połączeniu z innymi substancjami antybakteryjnymi lub technologiami obróbki, które skutecznie ograniczają rozwój patogenu. Badania potwierdzają skuteczność nizyny zastosowanej w połączeniu z pediocyną w ograniczaniu wzrostu *L. monocytogenes* w przypadku mięsa i tuszek indyjskich. Traktowanie niziną produktów pakowanych próżniowo skutkuje hamowaniem wzrostu, również w trakcie przechowywania chłodniczego [Walczycka, 2005].

Bakteriofagi

Bakteriofagi to wirusy, które w naturalny sposób infekują i zabijają bakterie, a ponadto są komponentami naturalnej mikroflory, towarzyszącej produkcji żywności od surowca po gotowy produkt [Grisi i Gorch-Lira, 2005]. Bakteriofagi uzyskuje się głównie z produktów żywnościowych, a także systemów produkcyjnych żywności. Jest to możliwe, gdy w danym produkcie znajduje się minimum 5 log jtk/g bakterii [Greer, 2005; Starostka i wsp. 2014]. Ponadto ich źródłem może być gleba, woda, ścieki czy odchody [Hagens i Offerhaus, 2008]. Bakteriofagi wykazują powinowactwo do jednego gospodarza, co oznacza, że atakują tylko jeden, konkretny szczep, chociaż istnieją fagi specyficzne w stosunku do wielu gospodarzy, co również wykorzystywane jest w produkcji żywności. W ostatnich latach stosowanie bakteriofagów w produkcji żywności zyskuje na popularności. Wśród dostępnych genomów bakteriofagów *L. monocytogenes* opisanych w bazie danych NCBI najdokładniej scharakteryzowano bakteriofagi A511, P100 i A118. Fag A511 wyizolowano z próbki ścieków i stwierdzono, że jest on zdolny do eliminacji 95% szczepów *L. monocytogenes*. Jego genom składa się z 137619 pz. [Pietracha i Misiewicz, 2016]. Genom bakteriofaga P100

posiada 131384 pz i 174 ORF (*Otwarte Ramki Odczytu*), natomiast A118 40834 pz i 72 ORF, z czego 26 z nich uczestniczy w liczbie komórek bakteryjnych [Bren, 2007].

Skuteczność stosowania bakteriofagów w dużej mierze zależy od rodzaju żywności, w której chcemy zredukować lub wyeliminować bakterię *L. monocytogenes*. W przypadku produktów płynnych (np. mleko, soki) możliwe jest obniżenie liczebności bakterii poniżej progu wykrywalności, natomiast w przypadku produktów stałych (np. mięso, surowe warzywa) o pięć rzędów wielkości [Carlton i wsp., 2005]. Kolejnymi czynnikami wpływającymi na skuteczność bakteriofagów w eliminacji *L. monocytogenes* są: stężenie bakteriofaga w roztworze, liczba bakterii oraz czas, w którym bakteriofag jest wprowadzany do surowca lub produktu. Stosowanie bakteriofaga powinno być dokładnie zaplanowane i powinno się ono odbyć we wczesnych etapach produkcji, ponieważ jeśli zostanie on zastosowany za późno, jego działanie może zostać znacznie obniżone, z uwagi na duży wzrost liczby bakterii [Pietrucha i Misiewicz, 2016].

Przeprowadzono badania mające na celu określenie wydajności działania preparatu LMP-102 (mieszanina fagów przeciwko *L. monocytogenes*) w stosunku do *L. monocytogenes*, którymi skażono próbki nieprzetworzonych produktów warzywnych i owocowych. Miano faga było wyższe o dwie jednostki logarytmiczne w stosunku do bakterii. Stwierdzono, że preparat ograniczał wzrost kolonii bakteryjnych o 2,0 - 4,6 jednostek logarytmicznych. W kolejnych latach wykazano, że liczbę jtk w sztucznie skażonych owocach można zmniejszyć nawet o 6,8 jtk [Leverentz i wsp., 2013].

Bakteriofagi stanowią skuteczne i bezinwazyjne narzędzie w walce ze skażeniami *L. monocytogenes*, a najskuteczniej działają w produktach, których pH wynosi 5,77-5,92. Wraz ze spadkiem pH bakteriofagi tracą swoje właściwości antydrobnoustrojowe. Stwierdzono, że szczególną skuteczność wykazują w przypadku takich produktów jak: świeże ogórki, por, chrzan, cebula, pasternak, słodkie ziemniaki, cukinia i mango [Pietrucha i Misiewicz, 2016]. Obecnie preparaty bakteriofagowe są w praktyce używane w systemach bezpieczeństwa żywności. Przykładowo preparat bakteriofagowy o nazwie Listex™, zawierający sześć indywidualnie wyizolowanych bakteriofagów, został zatwierdzony przez USFDA w 2007 roku do stosowania jako środek przeciwdrobnoustrojowy przeciwko *L. monocytogenes* w produktach gotowych do spożycia mięsnych i drobiowych.

Lizozym

Lizozym jest substancją antymikrobiologiczną, która naturalnie występuje w pokarmach pochodzenia zwierzęcego, takich jak jaja kurze czy mleko, oraz w wydzielinach ludzkich: mleko, łzy, ślina i śluz [Shahmohammadi 2018; Gridneva i in. 2021]. Enzym ten znajduje również

zastosowanie jako konserwant żywności, z uwagi na jego brak wpływu na zdrowie człowieka. Obecnie jest on powszechnie stosowany, głównie przy produkcji twardych serów pleśniowych. Wykazuje on szerokie działanie antimikrobiologiczne, a mechanizm jego działania polega na zrywaniu wiązań glikozydowych ściany komórkowej bakterii. Działanie to jest szczególnie skuteczne w zwalczaniu bakterii Gram-dodatnich. Lizozym powszechnie wykorzystywany jest w produkcji serów półtwardych, z uwagi na zdolność do hamowania wzrostu *Clostridium tyrobutyricum* [Nattress i Baker, 2003] oraz do kontroli obecności bakterii kwasu mlekowego w produkcji winiarskiej i piwowarstwie. W produkcji wędlin stanowi dodatek, który w połączeniu z chlorkiem i azotynem sodu, istotnie wpływa na wydłużenie czasu przechowywania wyrobów [Gajda i Bugła-Płoskońska, 2014].

Z uwagi na zdolność hydrolizy wiązań β -glikozydowych pomiędzy kwasem N-acetylmuraminowym i N-acetyloglukozaminą ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich lizozym jest skuteczną substancją do zwalczania *L. monocytogenes*. Stwierdzono m.in. redukcję bakterii Gram-dodatnich (*Bacillus thermospectra*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides* i *Listeria monocytogenes*) oraz zahamowanie ich wzrostu podczas czterotygodniowego okresu przechowywania po zastosowaniu żelatyny z dodatkiem lizozymu, EDTA i nizyny w produkcji szynki i kiełbasy bolońskiej [Salejda i Krasnowska, 2014].

2.3. METODY ZWALCZANIA BIOFILMU

L. monocytogenes w środowisku zakładów przetwórczych żywności jest w stanie (w sprzyjających warunkach) przetrwać nawet do kilku lat. Źle konserwowany sprzęt i niehigieniczny projekt zakładu skutkują powstawaniem nisz, w których gromadzą się wilgoć i materia organiczna stanowią idealne środowisko dla wzrostu i rozwoju bakterii. Biofilm powstaje na takich powierzchniach jak taśmy przenośnikowe, maszyny do krojenia, kostkowania, wałki, sita, rury czy posadzki. Udowodniono, że eliminacja biofilmu *L. monocytogenes* najłatwiejsza jest na powierzchniach wykonanych ze stali nierdzewnej. Istotne jest też, aby sprzęt nie posiadał krawędzi lub szczelin. Prawidłowo stosowane środki dezynfekcyjne zwykle skutecznie ograniczają wzrost i rozwój biofilmów bakteryjnych, jednakże nieprawidłowe stosowanie lub stosowanie w nieodpowiednich warunkach (m.in. na mokrą powierzchnię) wpływa na obniżenie skuteczności stosowanego środka.

W eradykacji biofilmu bakteryjnego w zakładach przetwórczych stosuje się przede wszystkim metody chemiczne, fizyczne, biologiczne oraz kombinowane (stanowiące połączenie wcześniej wymienionych).

Metody chemiczne obejmują chemiczne środki do czyszczenia i dezynfekcji powierzchni. Istotne jest, aby stosowane środki były skuteczne, bezpieczne, łatwe w użyciu i niepozostawiające żadnych toksycznych

pozostałości. Ze względu na wielowarstwową budowę biofilmów bakteryjnych środki chemiczne dostępne na rynku wykazują różny stopień efektywności. Wysoką efektywność w eradykacji biofilmu *L. monocytogenes* wykazują środki zawierające następujące środki chemiczne: nadtlenek wodoru, kwas nadoctowy, dwutlenek chloru oraz czwartorzędowe związki amoniowe. Jednakże niektóre związki chemiczne stymulują rozwój oporności drobnoustrojów, dlatego nadal poszukuje się naturalnych środków antymikrobiologicznych, które byłyby skuteczne w zwalczaniu nawet tak silnego patogenu, jak *L. monocytogenes*.

Do **metod fizycznych** zalicza się mechaniczne czyszczenie powierzchni poprzez m.in. skrobanie czy szorowanie. Metody te nie wykazują się dużą skutecznością z uwagi na obecność miejsc trudnodostępnych. Inną metodą fizyczną jest dezynfekcja termiczna. Udowodniono, że poddanie biofilmu temperaturze powyżej 95°C przez 100 min lub trzykrotne zamrażanie w temperaturze -12°C sprzyja eradykacji biofilmu. Zastosowanie pola elektromagnetycznego, zimnej plazmy, mieszaniny wolnych rodników lub terapii fotodynamicznej również powodują niszczenie struktur bakteryjnych, jednak nie znajdują one zastosowania w środowiskach zakładów produkcyjnych.

Przykładem **metod biologicznych** jest stosowanie bakteriofaga, np. Listex™ P100. Preparat zawiera bakteriofaga P100 w stężeniu 2×10^{11} PFU·mL⁻¹ i mnoży się w bakterii z rodzaju *Listeria*. Środek Listex™ P100 ogranicza biofilm na stali nierdzewnej nawet o 5 jednostek logarytmicznych. Współczesne badania wskazują również na skuteczność enzymów (tj. DNazy i proteinyazy K) w ograniczaniu wzrostu i rozwoju biofilmu *L. monocytogenes* [Daniluk i wsp., 2021].

2.4. METODY WYKRYWANIA *LISTERIA MONOCYTOGENES* W ŚRODOWISKU PRODUKCYJNYM ŻYWNOŚCI

Z punktu widzenia skutecznej diagnostyki źródeł skażenia mikrobiologicznego konieczne jest zachowanie odpowiednich praktyk poboru próbek wymazów na terenie zakładów produkcyjnych żywności. Kontroli polegać powinny zarówno powierzchnię obszaru przetwarzania i sprzętów, jak również środki ułatwiające przetwarzanie (np. sprężone powietrze, lód, woda itd.). Częstotliwość poboru i liczba pobieranych próbek powinna być oparta na indywidualnej analizie ryzyka. Odniesienia normatywne, na których opierają się odpowiednie praktyki poboru wymazów to:

- a) *ISO 6887-1* – Mikrobiologia łańcucha żywnościowego, *Ogólne zasady przygotowania zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych*;
- b) *ISO 7218* – Mikrobiologia żywności i pasz, *Ogólne zasady badań mikrobiologicznych*;
- c) *ISO 11290-1* – Mikrobiologia żywności i pasz, *Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes**;

d) *ISO/TS 11133 – Mikrobiologia żywności i pasz, Wytyczne przygotowania i sporządzania pożywek.*

Wilgotne i zabrudzone miejsca, szczególnie te trudno dostępne (szczeliny, dziury) i sprawiające trudność w dokładnej dezynfekcji, są potencjalnym miejscem bytowania *L. monocytogenes* na terenie zakładów przetwórczych żywności. Również porowate powierzchnie, włókniste materiały, rdzewiejące i puste urządzenia i zbiorniki stanowią doskonałe siedlisko dla tej bakterii. Takie miejsca należy potraktować ze szczególną uwagą, podczas poboru wymazów. Zdarza się, że konieczny jest demontaż sprzętu lub określonych jego elementów, aby pobór próbek wykonany został z należytą starannością. Należy jednak pamiętać, że *L. monocytogenes* może występować również na gładkich, wizualnie czystych powierzchniach. Wybór miejsc poboru powinien być oparty na danych gromadzonych na przestrzeni wielu lat dotyczących miejsc będących najczęściej środowiskiem bytowania bakterii, zarówno powierzchni mających, jak i nie mających kontaktu z żywnością (tabela 7).

Tabela 7. Lista miejsc poboru próbek celem określenia obecności *L. monocytogenes* w środowisku zakładów przetwórczych (20/08/2012, ANSES)

Powierzchnie nie mające kontaktu z żywnością	Powierzchnie mające kontakt z żywnością
podłogi, odpływy, zbiorniki wodne, węże, narzędzia czyszczące, przenośniki, rolki do przenośników, wewnętrzne panele wyposażenia, wózki widłowe, wózki ręczne, koła wózkowe, kosze na śmieci, zamrażarki, fartuchy, ściany, sufity, uszczelki wokół drzwi, klamki, krany, obszary do mycia, wagi podłogowe, szkielety konstrukcyjne, maszyny do robienia lodu, żebra chłodzące w kondensatorach, itd.	deski do krojenia, krajalnice, leje, rozdrabniacze, blendery, obieraczki, kolektory, urządzenia do napełniania i pakowania, pojemniki, rękawiczki, przenośniki taśmowe, itd.

Aby zwiększyć prawdopodobieństwo wykrycia określonych drobnoustrojów zdolnych do przetrwania w środowisku przetwarzania żywności, pobór próbek powinien odbywać się możliwie podczas procesu technologicznego, po co najmniej dwóch godzinach produkcji lub na koniec danej partii. Nie należy pobierać próbek po czyszczeniu lub dezynfekcji linii technologicznych, ponieważ komórki bakteryjne, które uległy uszkodzeniu wskutek działania środków dezynfekcyjnych, mogą nie wykazywać wzrostu na podłożach hodowlanych, mimo, że pozostają żywe. Wykrywanie *L. monocytogenes* na powierzchniach po czyszczeniu i dezynfekcji wskazuje, że stosowane procedury czyszczenia i dezynfekcji są nieskuteczne.

Do skutecznego poboru wymazu z powierzchni linii produkcyjnych niezbędne jest użycie rozcieńczalnika do zwilżania przyborów do poboru. W przypadku powierzchni łatwo dostępnych, z których pobiera się próbki w trakcie lub po zakończeniu przetwarzania wykorzystuje się rozcieńczalniki

proste, które nie zawierają neutralizatora. Zaleca się wykorzystanie rozcieńczalnika o następującym składzie roztwór peptonowy (1 g/l), sól fizjologiczna z peptonem lub ¼ stężony lub 0,25 stężony roztwór Ringera (quarter-strength Ringer's solution). Neutralizator ma za zadanie zatrzymać działanie substancji, będących pozostałościami środków dezynfekcyjnych. Nie powinno się go jednak stosować w przypadku, gdy nie oczekuje się obecności resztkowego środka dezynfekcyjnego, gdyż neutralizator może wykazywać szkodliwy wpływ na badane bakterie.

Pobór wymazów polega na energicznym pocieraniu wybranych powierzchni narzędziem wymazowym, a następnie jego zabezpieczenie w sterylnym pojemniku/woreczku. Transport próbek powinien odbywać się w chłodzonym pojemniku, w temperaturze od 1°C do 8°C. Badanie próbek powinno odbyć się nie później niż 24 godz. po ich dostarczeniu do laboratorium i nie później niż 36 godz. po ich poborze.

Metod służących wykrywaniu i różnicowaniu bakterii z rodzaju *Listeria* jest wiele i można je zaklasyfikować do trzech grup: klasyczne, molekularne i przesiewowe. Podlegają one regulacji przez takie organizacje jak: FDA (ang. *Food and Drug Administration*, Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków), USDA (ang. *U. S. Department of Agriculture*, Departament Rolnictwa Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej), FSANZ (ang. *Food Standard Australia New Zealand*, Agencja Standardów Żywności Australii i Nowej Zelandii) oraz ISO (ang. *International Organization of Standardization*, Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) [Gasanov i wsp., 2005].

2.4.1. Metody hodowlane

Do powszechnie stosowanych klasycznych metod mikrobiologicznych należą opisana w dziesiątym rozdziale *Instrukcji analityki bakteriologicznej* (ang. *Bacteriological Analytical Manual*, BAM) oraz przedstawiona w normach ISO 11290, które służą do wykrywania obecności i określeniu liczby bakterii *Listeria* spp. w próbkach żywności i środowiska produkcyjnego zakładów przetwórstwa żywności [Gasanov i wsp., 2005; Hitchins i wsp., 2017; PN-EN ISO 11290-1:2017-07; PN-EN ISO 11290-2:2017-07]. Pomimo niewątpliwiej szybkości i pracochłonności metody hodowlane pozostają metodami pierwszego wyboru. Według procedury BAM mikroorganizmy inkubowane są przez 24 - 48 godzin w 30°C w bulionie wzbogacającym dla *Listeria* BLEB (ang. *Buffered Listeria Enrichment Broth*), a następnie zaszczipione, za pośrednictwem posiewu powierzchniowego, na podłoże stałe selektywne, np. OXA (Oxford) lub PALCAM. Kontrolę wzrostu kolonii przeprowadza się w zależności od rodzaju podłoża – po 24 - 48 godzinach [Gasanov i wsp., 2005; Hitchins i wsp., 2017]. Zgodnie z procedurą ISO 11290 mikroorganizmy namnażane są w procesie dwuetapowym: najpierw przez 24 godziny w 30°C w bulionie pół-

Frasera, a następnie przez 24 do 48 godzin w 37°C w bulionie Fräsera. Kolejnym etapem jest posiew materiału na podłoże selektywne stałe dla *Listeria* spp. ALOA (ang. *Agar Listeria acc. to Ottaviani and Agosti*), OXA i PALCAM. Kontrolę wzrostu kolonii przeprowadza się w zależności od zastosowanego podłoża po 24 lub 48 godzinach [Gasánov i wsp., 2005; PN-EN ISO 11290-1:2017-07].

Klasyczne metody mikrobiologiczne umożliwiają wstępną identyfikację przynależności rodzajowej lub gatunkowej. Potwierdzenia przynależności gatunkowej bakterii z rodzaju *Listeria* dokonać można za pośrednictwem barwienia metodą Grama, po określeniu zdolności do ruchu oraz przeprowadzeniu szeregu analiz biochemicznych, które obejmują m.in.: ocenę zdolności do hemolizy, fermentacji węglowodanów, hydrolizy eskuliny, wytwarzania katalazy i oksydazy cytochromowej czy rozkładu mocznika [Hitchins i wsp., 2017]. Tradycyjne testy biochemiczne dostępne są komercyjnie w postaci zwalidowanych zestawów [Gasánov i wsp., 2005; Rocourt i Buchreiser, 2007].

Celem określenia serotypu *L. monocytogenes* wykorzystywana jest metoda aglutynacji szkiełkowej lub próbówkowej, która opiera się na reakcji antygenów somatycznych (O) i rzęskowych (H) z serią poliwalentnych i monowalentnych surowic [Hitchins i wsp., 2017; Madajczak i Majczyzna, 2009; Palumbo i wsp., 2003]. Z uwagi na to, że niektóre gatunki należące do *Listeria* spp. mogą posiadać takie same antygeny somatyczne jak szczepy należące do *L. monocytogenes* oraz subiektywny charakter interpretacji wyników, metoda aglutynacji może być wykorzystywana jedynie jako uzupełnienie, a nie podstawa identyfikacji [Górski, 2008]. Zaleca się stosowanie metod opartych na testach immunoenzymatycznych ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay) lub certyfikowanych przez Instytut Badawczy AOAC International (ang. *AOAC International Research Institute Performance Tested Method*, AOAC RI PTM) oraz AFNOR (fr. *Association Française de Normalisation*, Francuskie Stowarzyszenie Normalizacyjne) metod takich jak: Solus *Listeria* ELISA (Solus Scientific Solutions Ltd, UK), BACSpec *Listeria* (Eurofins GeneScan GmbH, Niemcy) oraz innych [Górski, 2008; AOAC, 2018].

2.4.1.1. Charakterystyka podłoży hodowlanych

Bakterie z rodzaju *Listeria* hodować można zarówno w warunkach tlenowych (na podłożach stałych) jak i beztlenowych (na podłożach płynnych). Czynnikiem sprzyjającym namnażaniu się bakterii jest zwiększony o 5-10% poziom CO₂ w atmosferze. Kolonie bakteryjne wzrastają na zwykłych podłożach hodowlanych, jednak z uwagi na obecność innych mikroorganizmów (np. w próbkach klinicznych lub w środowisku zakładów przetwórczych) częściej wykorzystywane są podłoża wybiórcze [Gasánov i wsp. 2005; Szewczyk, 2013;

Szych i Madajczak, 2010]. W niniejszym rozdziale opisano najczęściej stosowane podłoża hodowlane do hodowli bakterii z rodzaju *Listeria*.

Podłoża stałe

Podłoża stałe do hodowli bakterii z rodzaju *Listeria* wykorzystywane są zarówno do wstępnego namnażania jak i jako podłoża selektywne. Do wstępnego namnażania wykorzystywane są podłoża ogólne, np. TSA (ang. *Trypticase Soy Agar*, agar tryptonowo-sojowy), zawierające składniki niezbędne do wzrostu mikroorganizmów. W celu określenia przynależności do gatunku *L. monocytogenes* stosowane są stałe podłoża wybiórcze PALCAM, Oxford-agar lub ALOA. Czynniki selektywnymi obecnymi w podłożu PALCAM są antybiotyki polimyksyna B i ceftazydym, barwnik akryflawina oraz chlorek litu, natomiast czynnikiem różnicującym jest m.in. eskulina [Szych i Madajczak, 2010]. Chlorek litu jest czynnikiem wybiórczym, ponieważ większość drobnoustrojów jest podatna na wysokie jego stężenia. Kolonie *L. monocytogenes* rosnące na podłożu PALCAM przybierają ciemnoszare zabarwienie i są otoczone strefą czarnego podłoża. Czasami zaobserwować można czarną „kropkę” w centrum kolonii. W przypadku podłoża ALOA czynnikami selektywnymi są kwas nalidyksowy, polimyksyna B i cykloheksamidyna, a kolonie *L. monocytogenes* mają barwę zielononiebieską i otoczone są mętną sferą podłoża, spowodowaną rozkładem fosfatydyloinozytolu przez fosfolipazę C. Pożywka Oxford-agar to podłoże zawierające w swoim składzie mieszaninę antybiotyków, skrobię, eskulinę, chlorek litu i cytrynian amonowo-żelazowy (III), a kolonie przybierają barwę ciemnoszarą i są otoczone strefą czarnego podłoża.

Podłożem hodowlanym pozwalającym na określenie zdolności bakterii do wytwarzania biofilmu jest pożywka różnicująca CRA (ang. *Congo Red Agar*) [Freeman i wsp., 1989]. Kolonie bakterii zdolnych do tworzenia biofilmu przybierają na danym podłożu barwę czarną.

Podłoża płynne

Szeroki zakres tolerancji pH oraz temperatur, wykazywany przez pałeczki *Listeria* spp. wykorzystywany jest w diagnostyce listeriozy. Materiał kliniczny mieszany w proporcji 1:10 z bulionem, umieszczony w temperaturze 4°, daje informację czy w danej próbce występuje *L. monocytogenes*, ponieważ w przeciwieństwie do innych bakterii jest ona zdolna do wzrostu w danych warunkach temperaturowych. Posiew podpowierzchniowy (tzw. posiew kłuty) na podłoże półpłynne (0,2 - 0,4% agar z peptonem) umożliwia po 24 - 48 godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej na wskazanie

charakterystycznego dla pałeczek *Listeria* spp. ruchu w kształcie „parasola” [Gasanov i wsp., 2012].

Przykładami podłoży płynnych selektywnych do hodowli *L. monocytogenes* są położa pół-Frasera oraz Fräsera, które oprócz składników odżywczych (peptony i ekstrakty) zawierają również eskulinę i chlorek litu, cytrynian amonowo-żelazowy i dodatek selektywny w postaci mieszaniny antybiotyków: akryflawiny i kwasu nalidyksowego, które hamują rozwój bakterii Gram-ujemnych i większości Gram-dodatnich. *L. monocytogenes* hydrolizuje eskulinę do eskuletyny, która tworzy z żelazem (III), pochodzącym z cytrynianu, czarny kompleks, który barwi podłoże na kolor czarny lub ciemnoszary [Gasanov i wsp., 2012].

2.4.2. Metody molekularne

Molekularne metody identyfikacji mikroorganizmów z roku na rok zyskują coraz większe zainteresowanie wśród badaczy. Mimo konieczności zastosowania specjalistycznej aparatury i odczynników, metody te, poza oszczędnością czasu i pracy, zapewniają również najwyższy stopień precyzji i coraz częściej zyskują certyfikaty walidacji, stając się alternatywą dla metod konwencjonalnych, których na obecną chwilę nie są w stanie zupełnie zastąpić [Gasanov i wsp., 2005; Górski, 2008; Cremonesi i wsp., 2016; Witte i wsp., 2016; AFNOR, 2018a; AFNOR, 2018b; AOAC, 2018].

2.4.2.1. Metody oparte na amplifikacji DNA

Wszystkie metody amplifikacji bakteryjnego DNA opierają się na syntezie kopii docelowego fragmentu DNA przy użyciu termostabilnej polimerazy. Technika PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*, reakcja łańcuchowa polimerazy) pozwala na szybkie powielenie docelowego fragmentu DNA, a następnie jego uwidocznienie przy pomocy dostępnych technik detekcji [Jeyaletchumi i wsp., 2010]. W przypadku *L. monocytogenes* genami wykorzystywanymi w reakcjach PCR do identyfikacji gatunkowej są: *hlyA*, *iap*, *actA*, *inlAB* oraz gen białka *lmo0733*. Amplifikowane są również regiony międzygenowe 16S i 23S RNA oraz markery kodujące białka p60, aminopeptydazę C, fosfolipazę C, białko wiążące fibronektynę i Dth 18 [Aznar i Alarcón, 2003; Jung i wsp., 2003; Zhou i Jiao, 2005; Liu, 2006; Jeyaletchumi i wsp., 2010].

Konwencjonalna technika PCR nie pozwala na odróżnienie komórek *L. monocytogenes* żywych od martwych. Na wynik reakcji wpływa również niska zawartość *L. monocytogenes* w próbkach, obecność innych mikroorganizmów (np. *L. innocua*), ale również związków takich jak cząsteczki fenolowe, nukleazy bądź substancji hamujących wzrost drobnoustrojów stosowanych przy produkcji

żywności. W przypadku, gdy liczba komórek bakteryjnych w próbce jest zbyt niska, amplifikacji poddaje się fragmenty mRNA, w którym przy pomocy odwrotnej transkryptazy (RT-PCR, ang. *Reverse Transcription – PCR*) identyfikuje się obecność takich genów jak np. *hly*, *prfA* i *iap* [Jadhav i wsp., 2012].

2.4.2.2. Multiplex PCR

Multiplex PCR zakłada zastosowanie w reakcji kilku par starterów, które umożliwiają jednoczesną amplifikację wielu odcinków DNA. W przypadku identyfikacji bakterii z rodzaju *Listeria* spp. amplifikacji poddawany jest region wysoce konserwatywny 23S rRNA, natomiast w przypadku *L. monocytogenes* amplifikacji poddawany jest gen *hlyA* [Churchill i wsp., 2006]. W praktyce w reakcjach multiplex PCR amplifikacji poddawano również fragmenty genu *iap* z pozytywnym skutkiem. W wyniku reakcji uzyskano produkty o zróżnicowanej długości, co umożliwiło ich rozróżnienie na żelu agarowym. Metoda ta jest wysoce czuła, o czym świadczą badania przeprowadzone przez Zarei i wsp. [2013], które obejmowały 210 próbek mięsa i pozwoliły na określenie granicy wykrywalności tej metody na 13 komórek w 25 g próbki. Multiplex PCR pozwala również na jednoczesne oznaczanie w próbkach wielu gatunków drobnoustrojów. Lei i wsp. [2008] przy użyciu odpowiedniej mieszaniny starterów wykryli za pośrednictwem Multiplex PCR obecność 6 różnych patogenów obecnych w próbkach żywności: *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* i *Staphylococcus aureus*.

2.4.2.3. Real-Time PCR (PCR w czasie rzeczywistym)

Technika real-time PCR opiera się na klasycznej metodzie PCR, pozwala jednak na monitorowanie ilości produktów reakcji na każdym etapie amplifikacji i cechuje się znacznie wyższą czułością. Monitoring uzyskiwanych produktów możliwy jest dzięki zastosowaniu barwników fluorescencyjnych typu SYBR Green (interkalujących do dwuniciowego DNA) lub sond molekularnych znakowanych fluorochromami takimi jak: Hybridization Probes, TaqMan Molecular Beacons, jak również sondy typu Skorpion (komplementarne do powielanej sekwencji kwasu nukleinowego). Przy zastosowaniu w technice real-time PCR różnych rodzajów fluorochromów emitujących różne długości fali światła identyfikować można nawet kilka różnych sekwencji w analizowanej próbce [Studzińska i wsp., 2008; Romanek, 2011]. Wynik amplifikacji wyklucza konieczność przeprowadzenia rozkładu elektroforetycznego produktów PCR. Amplifikacja DNA i idący za nią wzrost emitowanej fluorescencji świadczy o obecności określonych fragmentów DNA, co daje potwierdzenie obecności

określonych drobnoustrojów. W praktyce nabyć można startery pozwalające na jednoczesną identyfikację *Listeria* spp. oraz *L. monocytogenes*, komplementarne do genu 23S rRNA oraz *hlyA*. Metoda real-time PCR wykorzystywana jest zarówno do identyfikacji jak i oznaczeń ilościowych *L. monocytogenes* w próbkach żywności oraz klinicznych [Churchill i wsp., 2006; Gasanov i wsp., 2005].

2.4.2.4. RT-PCR (ang. *Reverse Transcription-PCR*)

Obecność w próbce specyficznych sekwencji RNA jest wskaźnikiem żywych komórek bakteryjnych, ponieważ RNA (np. mRNA) znacznie szybciej ulega degradacji po śmierci komórkowej w stosunku do DNA. W technice RT-PCR wykorzystywany jest proces odwrotnej transkrypcji. Transkryptaza, w obecności startera, tworzy komplementarny DNA (cDNA), który służy następnie jako matryca w reakcji PCR. Metoda RT-PCR wykorzystywana jest m.in. do molekularnej identyfikacji *L. monocytogenes* w żywności [Churchill i wsp., 2006; Jadhav i wsp., 2012].

2.4.2.5. NASBA (ang. *Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*)

NASBA jest izotermalną metodą amplifikacji RNA. W mieszaninie reakcyjnej stosowane są następujące komponenty: polimeraza RNA T7, odwrotna transkryptaza, rybonukleaza H oraz dwa specyficzne startery DNA. Pierwszym etapem reakcji jest synteza cDNA za pośrednictwem odwrotnej transkrypcji. W kolejnych etapach RNA degradowane jest do kompleksu RNA-DNA z użyciem rybonukleazy H i zachodzi synteza nici DNA komplementarnej do cDNA. Fragmenty cDNA zawierają miejsca rozpoznawane przez polimerazę RNA faga T7, która syntetyzuje kopie anty-sensownego RNA, które następnie poddawane jest rozkładowi elektroforetycznemu na żelu agarozowym lub wykrywane w mieszaninie za pośrednictwem metod hybrydyzacji [Collins i wsp., 2002; Churchill i wsp., 2006; EFSA, 2013]. Technika NESBA daje możliwość detekcji żywych komórek bakteryjnych i nie wymaga użycia termocyklera, wymaga natomiast izolacji matrycowego RNA oraz stwarza ograniczenia w kwestii długości powielanych sekwencji (w zakresie od 120 do 250 nukleotydów) [Churchill i wsp., 2006; Fakruddin i wsp., 2010].

2.4.2.6. LAMP (ang. *Loop Mediated Isothermal Amplification*)

W odróżnieniu od PCR, technika LAMP polega na cyklicznej izotermalnej amplifikacji fragmentów DNA, bez konieczności użycia termocyklera, którego zastąpić można blokiem grzejnym lub łaźnią wodną. Startery, wykorzystywane w procedurze, są komplementarne do 6 – 8 miejsc docelowego DNA. Istnieje wysoce specyficzna i czuła procedura LAMP, opracowana przez Tang i wsp., [2017], która zakłada zastosowanie kalceiny lub manganu na etapie detekcji produktów oraz umożliwia identyfikację genu *hlyA*. Granica wykrywalności w wykrywaniu *L. monocytogenes* w czystych hodowlach wyniosła 2 jtk/reakcję.

2.4.2.7. Wykrywanie polimorfizmu pojedynczych nici DNA

Wykrywanie polimorfizmu pojedynczych nici DNA opiera się na założeniu, że każda pojedyncza zmiana w sekwencji nukleotydowej DNA może mieć wpływ na konformację cząsteczki i tym samym, na jej szybkość migracji w żelu z gradientem czynnika denaturującego, który może stanowić związek chemiczny, np. mocznik (ang. DGGE - *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) lub temperatura (ang. TGGE - *Temperature Gradient Gel Electrophoresis*). Przykładem metody wykorzystującej to założenie jest technika SSCP (ang. *Single-Strand Conformation Polymorphism*), w której rozkładowi elektroforetycznemu poddawane są fragmenty DNA o tej samej długości, ale różnej sekwencji nukleotydowej. Znajduje ona zastosowanie do wykrywania różnych gatunków *Listeria*, które po amplifikacji określonych genów dają produkty trudne lub niemożliwe do rozróżnienia na żelu agarowym [Jadhav i wsp., 2012].

2.4.3. Metody hybrydizacyjne

W metodach hybrydizacyjnych wykorzystuje się istniejące pomiędzy gatunkami różnice w sekwencjach nukleotydowych, które znakuje się przy pomocy sond oligonuleotydowych. Początkowo sekwencje docelowe znakowano izotopami promieniotwórczymi i wykrywano za pośrednictwem sygnału autoradiologicznego. Obecnie stosowane są sondy biotynylowane, sondy zawierające digoksygeninę lub znacznik fluorescencyjny. Techniki te są bardziej specyficzne niż metody serologiczne lub biochemiczne. W reakcji nie zachodzi amplifikacja DNA, co wpływa ograniczająco na czułość testu. Obecnie techniki te stosowane są rzadko, głównie w postaci szybkich testów [Liu i wsp., 2004; Gasanov i wsp., 2005].

2.4.4. Szybkie testy

Szybkie testy, mające na celu potwierdzenie lub zaprzeczenie obecności określonych drobnoustrojów w próbkach, wykorzystywane są, gdy istotny jest czas. Dla producentów i dystrybutorów żywności wykorzystanie szybkich testów zapewnia sprawną kontrolę jakości produktów i środowiska produkcji [Leong i wsp., 2014; Muhterem-Uyar i wsp., 2015; Nemati i wsp., 2016; D'Ostuni i wsp., 2016; Inslab, 2017]. Działanie tego typu testów opiera się np. na ocenie zmiany zabarwienia pożywki po inkubacji. Firma InSite™ opracowała m.in. szybki test *L. mono Glo*, który poza potwierdzeniem obecności *Listeria* spp. (zmiana barwy podłoża), umożliwia również wykrycie *L. monocytogenes* (fluorescencja podłoża) [Hygiena, 2017; Merck, 2017; Neogen, 2017; Romer Labs, 2017]. Należy jednak pamiętać, że szybkie testy nie mogą zastąpić metod klasycznych lub molekularnych, z uwagi na niską czułość. Mogą one jedynie stanowić wstęp do szerszych analiz lub być ich uzupełnieniem.

3. CELE PRACY I HIPOTEZY BADAWCZE

Cele pracy i hipotezy badawcze

Celem głównym badań jest monitoring zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego pod względem występowania pałeczek *Listeria monocytogenes* w próbkach środowiskowych zakładów, w surowcach, i produktach oraz określenie cech fenotypowych i genotypowych bakterii, co może pośrednio wpłynąć na poprawę stanu środowiska produkcyjnego i żywności, a tym samym na zmniejszenie ryzyka zachorowania konsumentów.

Cele szczegółowe:

- a) wyizolowanie i określenie przynależności gatunkowej izolatów *Listeria* spp., oznaczenie ich serotypów oraz występowania genów kodujących wybrane czynniki wirulencji,
- b) określenie stopnia podobieństwa genetycznego pałeczek *Listeria monocytogenes*, celem określenia dróg transmisji bakterii na terenie zakładów przetwórczych,
- c) określenie zdolności szczepów do tworzenia biofilmu i ocena wpływu wybranych czynników antybakteryjnych na proces jego formowania i na eradykację błony biologicznej,
- d) ocena wrażliwości drobnoustrojów na wybrane czynniki antybakteryjne (nizyna, lizozym, bakteriofagi, środki dezynfekcyjne, antybiotyki).

Hipotezy badawcze:

H1: Zarówno surowce, produkty, jak i środowisko zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego są miejscami bytowania bakterii *Listeria monocytogenes*.

H2: Potencjalnym źródłem transmisji bakterii na terenie zakładów przetwórczych są surowce i pracownicy.

H3: Bakterie wykazują zdolność do tworzenia biofilmu, a zastosowane środki antymikrobiologiczne ograniczają powstanie tej struktury oraz eliminują wytworzony biofilm.

H4: Bakterie są wrażliwe na środki dezynfekcyjne stosowane w zakładach przetwórczych, antybiotyki i biologiczne czynniki antybakteryjne.

H5: Większość wyizolowanych bakterii należy do serotypów najczęściej wywołujących listeriozę i posiada geny zlokalizowane na głównych wyspach patogeniczności.

4. MATERIAŁY I METODY

4.1. MATERIAŁY

4.1.1. Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiły próbki surowców (warzyw), produktów (mrożonek, soków i surówek) oraz wymazy z linii produkcyjnych, pobierane na terenie dwóch zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego, położonych w województwie kujawsko-pomorskim. Próbkę pobierano w okresie od marca do lipca (zakład A) oraz od lipca do listopada (zakład B) 2019 roku. Łącznie zgromadzono 320 próbek, w których stwierdzono obecność bakterii z rodzaju *Listeria*.

4.1.2. Wzorcowe szczepy bakteryjne

Szczepem wzorcowym wykorzystanym do analiz mikrobiologicznych z zastosowaniem metod dPCR (identyfikacja rodzajowa i gatunkowa bakterii z rodzaju *Listeria*) oraz RAPD (ocena podobieństwa genetycznego izolatów *L. monocytogenes*) był *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644™ (ang. *American Type Culture Collection*). Kontrolę dodatnią reakcji PCR w ocenie potencjału wirulencji stanowił DNA szczepu *L. monocytogenes* IW 41 z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów. Szczepy wzorcowe w badaniu serotypów izolatów bakteryjnych stanowiły szczepy CIP104794, CIP105449, CIP105448 oraz CIP78.38 (ang. *Collection of the Institut Pasteur*).

4.1.3. Podłoża hodowlane

Celem namnożenia i wstępnej identyfikacji szczepów *Listeria* spp. wykorzystano podłoża rekomendowane w PN-EN ISO 11290-1:1999/A1:2005 i późniejszej PN-EN ISO 11290-1:2017-07. Izolaty o potwierdzonej przynależności gatunkowej posiewano na podłoże stałe tryptonowo-sojowe lub zawieszano w bulionie BHI i mrożono, by przeprowadzić dodatkowe badania w późniejszym terminie. Wykaz i skład wykorzystanych podłoży hodowlanych przedstawiono poniżej:

1. bulion pół-Frasera (Merck, 110398) z cytrynianem amonu żelaza (III) (1.00092.0010) i suplementem selektywnym (1.00093.0010),
2. bulion Fräsera (Merck, 110398) z cytrynianem amonu żelaza (III) (1.00092.0010) i podwójną dawką suplementu selektywnego (1.00093.0010),
3. ALOA (ang. *agar Listeria acc. to Ottaviani and Agosti*) - agar dla *Listeria* wg Ottaviani i Agosti (Merck, 100427), dodatek wybiórczy do agaru Chromocult® dla *Listeria* (Merck, 100432), dodatek wzbogacający do agaru Chromocult dla *Listeria* (Merck, 100439),
4. TSA (ang. *Trypticase Soy Agar*) - agar tryptonowo-sojowy (Merck, 105458),
5. TSB (ang. *Trypticase Soy Broth*) – bullion tryptonowo-sojowy (Merck, 146610),
6. BHI (ang. *Brain Heart Infusion*) - bulion mózgowo-sercowy (BD, 299070),
7. CRA (ang. Congo Red Agar) wg. Freeman i in. [1989],
8. Mueller-Hinton agar + 5% odwłókniona krew końska i 20 mg/L β -NAD (MH-F) (GRASO Biotech, 1370).

4.1.4. Pozostałe odczynniki i drobny sprzęt laboratoryjny

Odczynniki oraz drobny sprzęt laboratoryjny wykorzystane podczas analiz molekularnych, do określenia zdolności do wytwarzania biofilmu, antybiotykooporności oraz MIC i MBC środków dezynfekcyjnych wymieniono poniżej:

1. Odczynniki:
 - Genomic Mini AX Bacteria Spin (A&A Biotechnology, 060100S);
 - Woda wolna od DNaz i Rnaz (Sigma-Aldrich, 1A19452)
 - Polimeraza DreamTaq Green (5 U/ μ l) z buforem (10x) (Thermo Fisher Scientific, 00439258);
 - dNTP, 10mM (A&A Biotechnology, 2001-200);
 - MgCl₂, 25 mM Thermo (Fisher Scientific, 00097122);
 - Tri(hydroksymetylo)aminometan (Bio Ultra Pure) (BioShop, 1A19760);
 - Kwas borowy (Biotechnology Grade) (BioShop, OH17856);
 - Kwas wersenowy (Biotechnology Grade) (BioShop, OM19432);
 - Agarozza Basica LE GQT (ABO, D00142PR);
 - Midori Green Advance DNA Stain (ABO, Ba20111208);
 - Marker wielkości DNA, GPB1000bp (GenoPlast Biochemicals, 00106030);

- Marker wielkości, GPB500bp (GenoPlast Biochemicals, 00647132).
2. Oligonukleotydy:
 - L1, L2, LM1, LM2 (Sigma-Aldrich, HA09099019-001, HA09099020-007, HA09099021-001, HA09099022-001);
 - OPA-11 (Oligo.pl);
 - lmo0737-R, lmo0737-L, lmo1118-R, lmo1118-L, ORF2819-L, ORF2819-R, ORF2110-L, ORF2110-R, prs-L, prs-R (Sigma-Aldrich);
 - iap-F, iap-R, actA-F, actA-R, inlB-F, inlB-R, plcB-F, plcB-R (Oligo.pl);
 - hlyA-F; hlyA-R; plcA-F; plcA-R; fbpA-F; dbpA-R (Oligo.pl);
 - prfA-F; prfA-R; mlp-F; mlp-R; inl-F; inl-R (Oligo.pl).
 3. Antybiotyki:
 - Ampicylina AM (2 µg) (BD, 64301967);
 - Penicylina P (1 IU) (BD, 64242954);
 - Erytromocyna E (15 µg) (BD, 64301559);
 - Meropenem MEM (10 µg) (BD, 64304463);
 - Sulfametoksazol z trimetoprimem SXT (23,75 µg : 1,25 µg) (BD, 64292983).
 4. Preparaty przeciwbakteryjne/przeciwbiofilmowe
 - nizyna (Novazym), 2,5%;
 - lizozym (GAP FOOD ADDITIVES), płyn 22%, aktywność $\geq 9 \times 10^6$ FIP U·ml⁻¹;
 - bakteriofag (Microcos), preparat Listex™ P100 PhageGuard zawierający bakteriofaga P100 w stężeniu 2×10^{11} pfu·ml⁻¹.
 5. Ważniejsza aparatura i sprzęt laboratoryjny:
 - Wirówka Mini Spin Plus (Eppendorf, 54532N1565557);
 - Termocykler MJ Mini (Bio-Rad, MM008562);
 - Termoblok TDB-120 (Biogenet Biosan, 010401-1106-0141);
 - Aparat do elektroforezy z zasilaczem (Bio-Rad, 041BR70586);
 - Czytnik mikropłytek Hidex Sense;
 - Transluminator Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad, 721BR07497);
 - Densytometr Biosan DEN-1;
 - 96-dołkowe płytki titracyjne, typ U (jednorazowe) (Profilab, 555.2.IS);
 - Wymazówki sterylne jednorazowe (Equimed, 31802552);
 - Cienkościenne probówki typu Eppendorf (0,2 ml) (Biozym Scientific GhbM, 710990);
 - Probówki typu Eppendorf (1,5 ml) (NEST Biotechnology, 615001).

4.1.5. Oprogramowanie komputerowe

Dane zestawiano i katalogowano przy użyciu programu Excel (Microsoft Office, USA). Analizę statystyczną danych przeprowadzono w programie Statistica 10 (StatSoft, USA). Wizualizacji produktów rozdziału elektroforetycznego dokonano przy użyciu programu ImageLab™ 4.0.1 (Bio-Rad, USA). Drzewo podobieństwa genetycznego obrazujące związki pomiędzy analizowanymi liniami genetycznymi uzyskano w programie FreeTree Ver. 0.9.1.50 i TreeView Ver. 1.6.6. [Pavliček i in., 1999].

4.2. METODY

4.2.1. Określenie przynależności rodzajowej i gatunkowej izolatów

Próbki pochodzące ze środowiska zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego pobierano z miejsc mających bezpośredni kontakt z żywnością (np. taśma produkcyjna, dysza dozująca itp.) oraz miejsc niemających kontaktu z żywnością (np. kratki odpływowe, posadzki itp.). Pobierano od 2 do 3 wymazów z miejsc wyznaczonych przez pracowników zakładu jako te, w których najczęściej wykrywano obecność bakterii oraz z miejsc, które mogły być potencjalnym siedliskiem patogenów w całym środowisku zakładu. Celem poznania źródeł zakażeń lub dróg transmisji pobierano również wymazy z odzieży roboczej pracowników i śluz dezynfekcyjnych, przez które pracownicy dostają się na teren zakładu. Wykaz miejsc poboru wymazów podano poniżej:

1. Linia produkcyjna: blanszownik, selektor, taśma, metalowe części pod taśmą, kalibrownik, pleksa/ścianki, tunele, krajalnica, ślimak, redler, selektor, winda, podajnik, glazurownik, przenośnik, płuczka, separator, prasa, zasobnik, rolki inspekcyjne, transporter, dysza dozująca, ocieraczki.
2. Pozostałe: posadzka, skrzynie z warzywami, drobny sprzęt, myjka na buty, kratka ściekowa, szczotki na buty, kurtka, spodnie, buty, śluza myjąco-dezynfekująca, zsymp, schody, woda do płukania warzyw.

Wymazy z linii technologicznych i powierzchni niemających kontaktu z przetwarzanym surowcem pobierano podczas procesu produkcyjnego, przed i po dezynfekcji linii produkcyjnej, zgodnie z normą PN-ISO 18593:2005. Surowce i produkty świeże oraz mrożone poddawano procedurom zgodnym z normą PN-EN ISO 11290-1:1999/A1:2005 oraz zastępującą ją PN-EN ISO 11290-1:2017-07. Wymazy wraz z surowcami i produktami gotowymi

transportowano do laboratorium w warunkach chłodniczych. Badanie przynależności rodzajowej i gatunkowej rozpoczynano tego samego dnia.

Celem wykrycia w próbkach obecności *Listeria* spp. bakterie wstępnie namnażano w bulionie pół-Frasera (Merck, Niemcy) w 30°C przez 24 godz. Następnie przenoszono 0,5 ml próbki do pożywki Frasera (Merck, Niemcy) i poddawano inkubacji w 37°C przez 48 godz. Bakterie z rodzaju *Listeria* wykazują zdolność do hydrolizy eskuliny, która stanowi jeden ze składników bulionu Frasera. Produktami reakcji są glukoza i 6,7-dihydroksykumaryna, która w połączeniu z jonami żelaza (III) tworzy kompleks barwny (zabarwienie brązowe lub czarne, co wskazuje na obecność w próbce bakterii z rodzaju *Listeria*). Próbki o charakterystycznym wybarwieniu przeszczepiano na podłoże stałe ALOA wykonywano posiew redukcyjny i inkubowano przez 24 – 48 godz. w 37°C. W przypadku podłoża ALOA czynnikami selektywnymi są kwas nalidyksowy, polimyksyna B i cykloheksamidyna, a kolonie *L. monocytogenes* mają barwę zielononiebieską i otoczone są mętną sferą podłoża, spowodowaną rozkładem fosfatydyloinozytolu przez fosfolipazę C.

4.2.2. Izolacja DNA bakteryjnego

W wyniku wstępnej identyfikacji uzyskano 54 próbki zawierające *Listeria* spp., z których wyodrębniono 74 izolaty. Poddano je oznaczeniom molekularnym w kolejnych etapach analiz. Materiał wyjściowy w procedurze izolacji DNA bakteryjnego stanowiły hodowle bakteryjne na bulionie BHI inkubowane w 37°C przez około 18 godz. Izolację DNA przeprowadzono metodą kolumnkową, zgodnie z instrukcją producenta zestawów Genomic Mini AX Bacteria Spin oraz Genomic Mini AX Bacteria+ Spin (A&A Biotechnology, Polska). Wyizolowane DNA bakteryjne przechowywano w temperaturze +4°C.

4.2.3. Różnicowanie *L. monocytogenes* od pozostałych *Listeria* spp. metodą dupleks-PCR

L. monocytogenes odróżniano od pozostałych *Listeria* spp. poprzez rozdział elektroforetyczny produktów reakcji dupleks-PCR. Przy użyciu specyficznych starterów wykrywano obecność genu *rrs* kodującego 16S rRNA (938 pz), który wskazuje na przynależność do rodzaju *Listeria* spp., oraz genu *hlyA* (702 pz) kodującego LLO, charakterystycznego dla gatunku *L. monocytogenes* [Churchill i wsp., 2006; Kuan i wsp., 2013]. Skład mieszaniny

reakcyjnej oraz warunki przebiegu reakcji przedstawiono w tabelach 8 i 9.

Tabela 8. Skład mieszaniny reakcyjnej dupleks-PCR [Skowron i wsp., 2018]

Składnik	Stężenie/objętość	Producent
Polimeraza DreamTaq™	1 U	Thermo Fisher Scientific, USA
Bufor do polimerazy DreamTaq™	1x	Thermo Fisher Scientific, USA
dNTP	0,2mM	A&A Biotechnology, Polska
Woda wolna od DNaz i RNaz	Do objętości 25 µl	BioShop, Kanada
Startery L1, L2, LM1, LM2	0,25 µM	Sigma-Aldrich, USA
DNA bakteryjne	2 µl	-

Tabela 9. Warunki przebiegu reakcji dupleks-PCR [Skowron i wsp., 2018]

Starter	Sekwencja startera (5' – 3')	Rozmiar ampliconu [pz]	Warunki reakcji
L1	CAGCAGCCGCGGTAATAC	938	94°C/2 min; 30 cykli: 94°C/30 s; 50°C/30 s; 72°C/1 min; 72°C/5 min
L2	CTCCATAAAGGTGACCCT		
LM1	CCTAAGACGCCAATCGAA	702	
LM2	AAGCACTTGCAACTGCTC		

Produkty reakcji rozdzielano na 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika Midori Green Advance w buforze TBE (1x), pod napięciem 80 V przez 85 min. Próbkę pozytywną reakcji stanowił szczep wzorcowy *L. monocytogenes* ATCC® 7644™, natomiast kontrolę ujemną próbka nie zawierająca bakteryjnego DNA. Zastosowano marker wielkości DNA. Wizualizacji wyników dokonywano przy pomocy transluminatora Gel Doc™ XR+.

4.2.4. Określenie pokrewieństwa genetycznego izolatów bakteryjnych

Określeniu pokrewieństwa genetycznego metodą RAPD (ang. *Random Amplification of Polimorphic DNA*, Przypadkowa Amplifikacja Polimorficznego DNA) poddano 74 izolaty, których przynależność gatunkową określono metodą

duplex-PCR. Skład wyjściowej mieszaniny reakcyjnej oraz warunki przebiegu reakcji przedstawiono w tabelach 10 i 11.

Tabela 10. Skład mieszaniny reakcyjnej RAPD [Skowron i wsp., 2019]

Składnik	Stężenie/objętość	Producent
Bufor PCR z MgCl ₂	1x, 2,0mM	Promega, USA
MgCl ₂	1,5 mM	ABO, Polska
dNTP	200 μM	Promega, USA
Starter OPA-11	1,0 μM	Oligo.pl, Polska
Polimeraza DNA Taq	1,25 U	Promega, USA
Woda wolna od DNaz i RNaz	Do objętości 25 μl	Merck, Polska
DNA bakteryjne	3 μl	-

Tabela 11. Warunki przebiegu reakcji RAPD [Skowron i wsp., 2019]

Starter	Sekwencja startera (5'-3')	Warunki reakcji
OPA-11	CAATCGCCGT	6 cykli: 94°C/1 min, 30°C/2 min, 72°C/1 min; 35 cykli: 94°C/15 s, 37°C/1 min, 72°C/45 s; 72°C/10 min

Produkty reakcji rozdzielano na 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika Midori Green Advance, pod napięciem 80 V przez 150 min. Zastosowano marker wielkości DNA (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder). Celem określenia pokrewieństwa izolatów prążki ponumerowano, zmierzono ich długość oraz określono macierze podobieństwa według współczynnika Dice'a [Dice, 1945] w programie Molecular image Gel Doc™ XR (Bio-Rad, USA). W tym samym programie przygotowano również zbiorczy system binarny. Następnie w programie programie FreeTree Ver. 0.9.1.50 [Pavlicek i wsp., 1999] otrzymano wspólny diagram produktów oraz macierz podobieństwa wg współczynnika Dice'a [Dice, 1945] i na jej podstawie uzyskano drzewo podobieństwa genetycznego obrazujące związki pomiędzy analizowanymi liniami w programie TreeView Ver. 1.6.6.

4.2.5. Serogrupowanie szczepów bakteryjnych

Celem ustalenia przynależności do serogrup posłużono się procedurą opracowaną przez Doumitha i wsp. [2004]. Badaniu poddano próbki, które stanowiły przedstawicieli grup filogenetycznych, wyłonionych na podstawie dendrogramu. Serogrupowaniu poddano 13 szczepów,

które stanowiły reprezentantów 13 pokrewnych linii filogenetycznych wyznaczonych w badaniu pokrewieństwa genetycznego. Skład mieszaniny reakcyjnej multiplex-PCR oraz warunki przebiegu reakcji przedstawiono w tabelach 12 i 13.

Tabela 12. Skład mieszaniny reakcyjnej [Doumith i wsp., 2004]

Składnik	Stężenie/objętość	Producent
Polimeraza DreamTaq™ Green	2 U	Thermo Fisher Scientific, USA
Bufor do polimerazy DreamTaq™ Green	1x	Thermo Fisher Scientific, USA
dNTP	0,2 mM	A&A Biotechnology
Startery <i>lmo0737</i> , ORF2819, ORF2110	1 μM	Sigma-Aldrich, USA
Startery <i>lmo1118</i>	1,5 μM	Sigma-Aldrich, USA
Startery <i>prs</i>	0,2 μM	Sigma-Aldrich, USA
Woda wolna od DNaz i RNaz	Do objętości 25 μl	BioShop, Kanada
DNA bakteryjne	1 μl	-

Tabela 13. Warunki przebiegu reakcji multiplex-PCR [Doumith i wsp., 2004]

Starter	Sekwencja startera (5' – 3')	Rozmiar ampliconu [pz]	Warunki reakcji
<i>lmo0737</i>	AGGGCTTCAAGGACTTACCC	691	94°C/3 min; 35 cykli: 94°C/24 s, 53°C/69 s, 72°C/69 s; 72°C/7 min
	ACGATTTCTGCTTGCCATTC		
<i>lmo1118</i>	AGGGGTCTTAAATCCTGGAA	906	
	CGGCTTGTTCCGCATACTTA		
ORF2819	AGCAAAATGCCAAAACCTCGT	471	
	CATCACTAAAGCCTCCCATTTG		
ORF2110	AGTGGACAATTGATTGGTGAA	597	
	CATCCATCCCTTACTTTGGAC		
<i>prs</i>	GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG	370	
	CAAAGAAACCTTGGATTGCGG		

Produkty reakcji multiplex-PCR rozdzielano na 2% żelu agarozowym z barwnikiem Midori Green Advance, w buforze TBE (1x), pod napięciem 80 V przez 80 min, wraz z markerem wielkości DNA oraz kontrolą zerową (próbka nie zawierająca DNA). Szczepy wzorcowe stanowiły szczepy pochodzące z Kolekcji Instytutu Pasteura: CIP104794, CIP105449, CIP105448 oraz CIP78.38. Wizualizacji wyników dokonywano w świetle UV przy użyciu transluminatora Gel Doc™ XR+.

4.2.6. Wykrywanie genów kodujących wybrane czynniki wirulencji techniką multipleks PCR

Przy użyciu techniki multipleks-PCR wykrywano obecność u badanych szczepów *L. monocytogenes* 10 genów kodujących następujące czynniki wirulencji: białko FbpA (*fbpA*), fosfolipazy (*plcA* i *plcB*), listeriolizyny O (*hlyA*), internaliny (*inlA* i *inlB*), białko powierzchniowe (*actA*), adhezyny (*iap*), metaloproteazy (*mpl*) oraz czynnik regulujący zjadliwość (*prfA*). Badaniu poddano próbki będące reprezentantami grup filogenetycznych, wyłonionych na podstawie dendrogramu. W tym celu wykonano trzy reakcje multipleks-PCR. Jako kontrolę ujemną reakcji PCR wykorzystano mieszaninę reakcyjną z wodą zamiast DNA. Kontrolę dodatnią reakcji PCR stanowił DNA szczepu *L. monocytogenes* IW 41 z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów posiadający wszystkie uwzględnione w badaniu geny wirulencji. Reakcje przeprowadzono w termocyklerze MasterCycler Pro (Eppendorf). Szczegóły dotyczące wykonanych reakcji, skład mieszaniny reakcyjnej oraz charakterystykę zastosowanych w starterów przedstawiono w tabelach 14 i 15.

Tabela 14. Skład mieszaniny reakcyjnej multiplex-PCR

Składnik	Stężenie/objętość	Producent
Polimeraza Taq	1 U	Promega, USA
Bufor do polimerazy Taq	1x	Promega, USA
dNTP	10 mM	Promega, USA
MgCl ₂	25 mM	ABO, Polska
Startery: <i>fbpA</i> , <i>plcA</i> , <i>hlyA</i> , <i>plcB</i> , <i>inlB</i> , <i>actA</i> , <i>iap</i> , <i>inlA</i> , <i>mpl</i> , <i>prfA</i>	10 μM	Oligo.pl, Polska
Woda wolna od DNaz i RNaz	Do objętości 25 μl	Sigma-Aldrich, USA
DNA bakteryjne	2 μl	-

Tabela 15. Warunki przebiegu reakcji multiplex-PCR

Reakcja	Nazwa startera	Sekwencja startera (5'-3')	Wielkość produktu [pz]	Piśmiennictwo	Warunki reakcji
I	<i>fbpAF</i>	TTATTCCTCGCATCCTAGC	435	Skowron i wsp., 2019	94°C/2 min; 35 cykli: 94°C/15 s, 48,5°C/30 s, 72°C/50; 72°C/1 min.
	<i>fbpAR</i>	TATCAATTCGACCTGCTGAG			
	<i>plcAF</i>	ACACGAGCAATAAAATCCCT	278	Skowron i wsp., 2019	
	<i>plcAR</i>	ATACTGACGAGGTGTGAATG			
	<i>hlyAF</i>	TTTTCGATTGGCGTCTTAGGA	101	Suo i wsp., 2010	
	<i>hlyAR</i>	ACTGAAGCAAAGGATGCATCTG			
II	<i>plcBF</i>	GCAAGTGTCTAGTCTTTCCGG	794	Franciosa i wsp., 2005	94°C/2 min; 16 cykli: 94°C/30 s, 57°C/45 s, 72°C/45 s, 19 cykli: 94°C/30 s, 49°C/45 s, 72°C/45 s; 72°C/1 minuta
	<i>plcBR</i>	ACCTGCCAAAGTTTGCTGTGA			
	<i>inlBF</i>	TCCGACTAAACAAGGCTATG	302	Skowron i wsp., 2019	
	<i>inlBR</i>	TGTACCATAATTTCCGCCA			
	<i>actAF</i>	ACGAACAAAGCAGACCTAAT	231	Skowron i wsp., 2019	
	<i>actAR</i>	TGTACCATAATTTCCGCCA			
	<i>iapF</i>	ACAAGCTGCACCTGTTGCAG	131	Rawool i wsp., 2007	
	<i>iapR</i>	TGACAGCGTGTGTAGTAGCA			
III	<i>inlAF</i>	CAGGCAGCTACAATTACACA	2341	Franciosa i wsp., 2005	
	<i>inlAR</i>	ATATAGTCCGAAAACCACATCT			
	<i>mpIF</i>	TATGACGGTAAAAGCAGATT	1458		
	<i>mpIR</i>	TTCCAAGCTTCAGCAACTT			
	<i>prfAF</i>	CATGAACGCTCAAGCAGAAG	706		
	<i>prfAR</i>	AATTTTCCAAGTAGCAGGA			

Uzyskane produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika interkalującego Midori Green w buforze 1×TBE (Tris/Kwas Borowy/EDTA) w obecności wzorca wielkości DNA (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder). Elektroforezę prowadzono przy napięciu 90V przez 60 min. Do wizualizacji i archiwizacji elektroforegramów wykorzystano system GelDoc 2000.

4.2.7. Określenie MIC i MBC czynników przeciwdrobnoustrojowych dla szczepów *Listeria monocytogenes* metodą mikroplytkową

Przetestowano wpływ trzech różnych substancji przeciwdrobnoustrojowych: nizyny, lizozymu i bakteriofaga metodą mikroplytkową (tabela 16). Na płytki 96-dołkowe pipetowano po 50 µl jałowego podłoża TSB, 50 µl wybranych substancji: nizyny, bakteriofaga oraz lizozymu. Substancje rozcieńczano w szeregu 10-krotnych (bakteriofag) lub 2-krotnych (lizozym i nizyna) w TSB. Następnie do studzienek dodawano po 10 µl zawiesiny bakteryjnej w dwóch powtórzeniach. Do jej przygotowania wykorzystano hodowle bakterii na podłożu TSA inkubowane w 37°C przez 24 godz. Z wyrosłych kolonii przygotowywano zawiesiny w TSB o gęstości 0,5 w skali MacFarlanda. Kontrolę pozytywną stanowiły dołki zawierające TSB z zawiesiną bakteryjną, natomiast kontrolę negatywną stanowiły dołki zawierające wyłącznie TSB. Przetestowano również jałowość samych preparatów antybakteryjnych w TSB. Pojedyncza płytka stanowiła test dla jednego szczepu. Płytki inkubowano w temperaturze 37 °C przez 24 godz. w komorze wilgotnej. MIC (minimalne stężenie hamujące) określano na podstawie zmętnienia pożywki w dołkach. Następnie przy użyciu pipety wielokanałowej nanoszono zawiesinę bakteryjną na pożywkę ALOA, celem określenia MBC (minimalnego stężenia bakteriobójczego) i inkubowano 48 godz. w 37 °C.

Tabela 16. Układ płytki 96-dółkowej

	Fag +		Niz +		Liz+ LM		Fag	Niz	Liz	LM	TSB	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
A	10 ¹⁰		50%		25%		10 ¹⁰	50%	25%			
B	10 ⁹		25%		12,5%		10 ⁹	25%	12,5%			
C	10 ⁸		12,5%		6,25%		10 ⁸	12,5%	6,25%			
D	10 ⁷		6,25%		3,13%		10 ⁷	6,25%	3,13%			
E	10 ⁶		3,13%		1,57%		10 ⁶	3,13%	1,57%			
F	10 ⁵		1,57%		0,79%		10 ⁵	1,57%	0,79%			
G	10 ⁴		0,79%		0,40%		10 ⁴	0,79%	0,40%			
H	10 ³		0,40%		0,20%		10 ³	0,40%	0,20%			

LM – zawiesina *Listeria monocytogenes*; Fag - bakteriofag; Niz - nizyna; Liz – lizozym; TSB – pożywka.

4.2.8. Określenie zdolności szczepów *L. monocytogenes* do tworzenia biofilmu i wpływu różnych czynników na ten proces

4.2.8.1. Określenie zdolności do tworzenia biofilmu

Badaniu poddano 13 szczepów reprezentujących poszczególne grupy filogenetyczne wyłonione na podstawie dendrogramu. Zdolność do tworzenia biofilmu określano dwiema metodami.

- A. Hodowli bakterii na agarze z czerwienią Konga (CRA, Congo Red Agar) [Freeman i in., 1989], która jest klasyczną metodą najczęściej stosowaną do fenotypowego wykrywania produkcji EPS u bakterii na podstawie koloru kolonii po inkubacji. Badane szczepy *Listeria monocytogenes* zaszczipiono liniowo na ww. pożywce i inkubowano przez 18 godz. w temp. 37°C, a następnie przez kolejną dobę w temperaturze pokojowej. Kolor kolonii określano w 6-stopniowej skali, w której kolonie bardzo czarne, czarne i prawie czarnym świadczyły o zdolności do wytwarzania biofilmu, a kolonie bordowe, czerwone i bardzo czerwone – o braku takich właściwości [Arciola i in. 2002] (tabela 17).

Tabela 17. Kryteria oceny zdolności do tworzenia biofilmu określona na podstawie testu CRA

Zabarwienie kolonii	Zdolność do tworzenia biofilmu
Bardzo czarny (ang. <i>Very black, vb</i>)	+
Czarny (ang. <i>Black, b</i>)	+
Prawie czarny (ang. <i>Almost black, ab</i>)	+
Bordowy (ang. <i>Bordeaux, brd</i>)	-
Czerwony (ang. <i>Red, r</i>)	-
Bardzo czerwony (ang. <i>Very red, vr</i>)	-

B. Metoda mikropłytkowa wykorzystuje polistyrenowe płytki, w których komórki tworzące biofilm barwione są przy użyciu fioletu krystalicznego. W celu dokonania oceny ilości biomasy biofilmu oznacza się absorbancję z użyciem czytnika płytek mikrotitracyjnych. Metoda mikropłytkowa pozwala również ocenić skuteczność środków w zapobieganiu tworzenia biofilmu i w jego eradykacji. Szczepy namnażano na podłożu TSA (inkubacja w 37°C, 48 godz.). Następnie w TSB przygotowywano zawiesiny o gęstości 0,5 w skali McFarlanda. Do studzienek wprowadzano po 90 µl TSB i dodawano do nich po 10 µl zawiesiny każdego szczepu w trzech powtórzeniach. Jako kontrolę wykorzystano samą pożywkę TSB. Doświadczenie przeprowadzono w trzech różnych warunkach temperaturowych: 37, 20 i 4 °C, stanowiących odpowiednio: warunki optymalne do wzrostu bakterii, warunki, w których bakterie wykazują zdolność do ruchu oraz warunki przechowalnicze żywności. Inkubacja w 37°C trwała 24 godz., a w temperaturach niższych – 72 godz. Po upływie tego czasu zawiesiny odpipetowano, przepłukano dołki trzykrotnie wodą destylowaną i pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze 37 °C przez 20 min. Następnie do dołków dodawano po 100 µl metanolu i wytrząsano w temperaturze pokojowej (RT) przez 20 min. Po usunięciu MeOH pozostawiono płytki do wyschnięcia w temperaturze 37 °C przez 20 min, a następnie dodano studzienek po 100 µl 0,1 % fioletu krystalicznego i ponownie wytrząsano przez 20 min w RT. Fiolet krystaliczny odpipetowano, dołki przepłukano wodą i pozostawiono do odparowania w temperaturze 37 °C przez 20 min. Następnie dodawano do dołków po 100 µl MeOH i wytrząsano przez 5 min w RT [Kwiecińska-Piróg i wsp., 2014]. Pomiar absorbancji wykonywano przy użyciu czytnika mikropłytek Hidex Sense przy długości fali $\lambda = 470$. Zdolność do formowania biofilmu oceniano porównując uśrednione wartości powtórzeń pomiarów do wartości absorbancji uzyskanej dla kontroli negatywnej. W tabeli 18 przedstawiono poziomy zdolności do tworzenia biofilmu i odpowiadające im zakresy absorbancji.

Tabela 18. Poziom zdolności do tworzenia biofilmu i odpowiadający mu zakres absorbcancji [wg Kwiecińskiej-Piróg i wsp., 2014]

Zdolność do tworzenia biofilmu	Zakres absorbcancji
Brak	$A \leq T$
Słaba	$T < A \leq 2T$
Umiarkowana	$2T < A \leq 4T$
Silna	$4T < A \leq 8T$
Bardzo silna	$8T < A$

A – absorbcancja, T – wartość graniczna absorbcancji

4.2.8.2. Wpływ nizyny, lizozymu i bakteriofaga na wytwarzanie biofilmu

Do testu wybrano sześć szczepów *L. monocytogenes*, które wykazały bardzo silną zdolność wytwarzania biofilmu w temperaturach 37 i 20°C (żaden szczep nie formował biofilmu w warunkach chłodniczych). Wpływ czynników przeciwdrobnoustrojowych na zdolność do tworzenia biofilmu przez wybrane szczepy *L. monocytogenes* oceniono metodą mikroplótkową. Wykorzystano konkretne stężenia nizyny, lizozymu i bakteriofaga odpowiadające oznaczonym wcześniej minimalnym stężeniom hamującym (MIC). Do dołków płytki dodano po 50 µl TSB oraz po 50 µl nizyny, lizozymu i bakteriofaga w TSB tak, aby uzyskać stężenia: 50% nizyny, 25% lizozymu i 10^{10} pfu·ml⁻¹. Następnie do studzienek dodawano po 10 µl zawiesiny bakteryjnej każdego testowanego szczepu w trzech powtórzeniach i inkubowano w dwóch różnych temperaturach: w 37°C przez 24 godz. i w 20°C przez 72 godz. w komorze wilgotnej. Po tym czasie zastosowano procedurę oceny wytwarzania biofilmu analogicznie, jak w p. 5.2.9.1.B.

4.2.8.3. Ocena wpływu nizyny, lizozymu i bakteriofaga na eradykację wytworzonego wcześniej biofilmu

Wykorzystano sześć szczepów o wysokim potencjale biofilmotwórczym do wytworzenia biofilmu w pożywce TSB na płytkach mikrotitracyjnych. Podłoże nie zawierało żadnych czynników hamujących. Po 10 µl zawiesin

bakterii (0,5 w skali McFarlanda w TSB) dodano do studzienek zawierających po 90 µl TSB. Inkubację prowadzono w temperaturach: w 37°C przez 24 godz. i w 20°C przez 72 godz. w komorze wilgotnej. Po tym czasie odpipetowano pożywkę wraz z bakteriami planktonicznymi i dołki trzykrotnie przepłukano jałową solą fizjologiczną. Do odpowiednich studzienek dodano po 100 µl nizyny, lizozymu i bakteriofaga w 0,85% NaCl o stężeniach: 50% nizyny, 20% lizozymu oraz 10^{10} pfu·ml⁻¹ i przechowano w 37°C przez 24 godz. i w 20°C przez 72 godz. w komorze wilgotnej. Następnie zastosowano procedurę wybarwienia biofilmu, jak w p. 5.2.9.1.B.

4.2.9. Ocena antybiotykoodporności

Oporność izolatów na antybiotyki oceniano przy zastosowaniu metody krążkowo-dyfuzyjnej oraz w oparciu o *Tabele interpretacji wartości granicznych minimalnych stężeń hamujących (MIC) oraz wielkości stref zahamowania wzrostu* (wersja 11.0, obowiązująca od 1.01.2021 r.) [EUCAST, 2021]. W tym celu przygotowano inokulum o gęstości 0,5 w skali McFarlanda zawieszając kolonie *L. monocytogenes* (pochodzące z całonocnej hodowli na podłożu ogólnym) w soli fizjologicznej. Na podłoże stałe MH-F (z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi końskiej i 20 mg/L β-NAD dla drobnoustrojów wymagających) o temp. pokojowej inokulowano zawiesinę bakteryjną przy pomocy sterylnej wymazówki bawełnianej, rozprowadzając równomiernie zawiesinę w trzech kierunkach na płytce. Po upływie 15 min nakładano krążki nasączone antybiotykami rekomendowanymi przez EUCAST: ampicyliną (AM, 2 µg); erytromycyną (E, 15 µg), meropenem (MEM, 10 µg), penicyliną (P, 1IU) oraz sulfametoksazolem z trimetoprimem (SXT, 23,75 µg : 1,25 µg) (BD, USA), należące do grup antybiotyków: penicylin (AM, P), makrolidów (E), karbapenemów (MEM) i antybiotyków mieszanych (SXT). Płytki następnie inkubowano w temperaturze 37 °C przez 18 godz. Antybiotykoodporność określano po zmierzeniu średnic stref zahamowania wzrostu wokół krążków antybiotykowych i porównaniu ich z wartościami normatywnymi. Celem interpretacji stosowano ogólnie przyjęte pojęcia:

- A. Rozszerzona oporność (ang. *Extensive drug resistance*, XDR) – niewrażliwość na co najmniej jeden antybiotyk z nie więcej niż dwóch grup terapeutycznych, wykorzystywanych w leczeniu zakażeń danym gatunkiem drobnoustroju;
- B. Wielolekooporność (ang. *Multidrug resistance*, MDR) – niewrażliwość na co najmniej jeden z antybiotyków, należących do trzech lub więcej grup.
- A. Całkowita lekooporność (ang. *Pandrug resistance*, PDR) – oporność na wszystkie dostępne antybiotyki o zarejestrowanym działaniu wobec

danego gatunku drobnoustrojów [Magiorakos i wsp., 2012; Żabicka i wsp., 2012; Exner i wsp., 2017].

4.2.10. Określenie wpływu wybranych środków dezynfekcyjnych

Szczepy bakterii namnażano na podłożu stałym TSA (inkubacja w 37°C, 24 godziny). Następnie w bulionie TSB przygotowywano zawiesiny bakteryjne o gęstości 0,5 w skali McFarlanda. Do płytki mikrotitracyjnej dodano po 50 µl podłoża TSB. Do każdego z pierwszych dołków w kolumnie dodano po 50 µl wybranych środków dezynfekcyjnych (tabela 19) i wykonano szeregi 2-krotnych rozcieńczeń. Następnie dodano po 10 µl zawiesiny bakteryjnej i inkubowano przez 24 godziny w 37 °C. Po tym czasie odczytano wartości MIC, a także zaszczipiono zawiesiny z każdego dołka na pożywkę ALOA, celem określenia MBC i inkubowano 48 godz. w 37 °C. Oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach. W tabeli 20 przedstawiono charakterystykę testowanych środków dezynfekcyjnych.

Tabela 19. Środki dezynfekcyjne testowane w badaniach

Nazwa środka	Substancje biologicznie aktywne	Producent
Tesol (10%)	podchloryn sodu (53 g aktywnego Cl/dm ³)	Radex, Polska
Tesol ME	podchloryn sodu (27-43 g aktywnego Cl/dm ³)	Radex, Polska
Alusol	kwas ortofosforowy/alkohole C9-11 etoksylovane	Radex, Polska
Barsan	chlorek didecyldimetyloamoniowy (3,33 g/ 100 g)	Radex, Polska
Deptal CMC	podchloryn sodu (45,3 g aktywnego chloru/kg)	Kersia, Czechy
Deptil HDS	70,4 % etanol	Kersia, Czechy
Topax 66 (3%)	0,1-0,25 podchloryn sodu 0,1-0,25 NaOH	Ecolab, USA
Topactive DES (3%)	0,025-0,1 kwas nadoctowy 0,25-0,5 nadtlenek wodoru 0,25-0,5 kw. octowy	Ecolab, USA
Oxonia Active (3%)	0,1-0,25 kwas nadoctowy 0,5-1,0 nadtlenek wodoru 0,1-0,25 kwas octowy	Ecolab, USA

Tabela 20. Charakterystyka środków dezynfekcyjnych zastosowanych w badaniu

Nazwa środka	Substancje biologicznie aktywne; producent	Grupa dezynfektantów	Stężenie robocze [%] – do użycia po rozcieńczeniu - rekomendowane przez producenta
Tesol (10%)	podchloryn sodu (53 g aktywnego Cl/ dm ³); <i>Radex, Polska</i>	chlorowce	1 – 3%
Tesol ME	podchloryn sodu (27-43 g aktywnego Cl/dm ³); <i>Radex, Polska</i>	chlorowce	2%
Deptal MCL	podchloryn sodu (45,3 g aktywnego chloru/kg); <i>Kersia, Czechy</i>	chlorowce	2 – 5%
Topax 66	0,1-0,25 podchloryn sodu, 0,1-0,25 NaOH; <i>Ecolab, USA</i>	chlorowce	3%
Alusol	kwas ortofosforowy/alkohole C9-11 etoksyloowane; <i>Radex, Polska</i>	kwasy nieorganiczne	1 – 5%
Barsan	chlorek didecyldimetyloamoniowy (3,33 g/ 100 g); <i>Radex, Polska</i>	czwartorzędowe związki amoniowe	1%
Deptil HDS	70,4 % etanol <i>Kersia; Czechy</i>	alkohole	Bez rozcieńczenia – środek gotowy do użycia
Topactive DES	0,025-0,1 kwas nadctowy, 0,25-0,5 nadtlenek wodoru, 0,25-0,5 kwas octowy; <i>Ecolab, USA</i>	związki utleniające	3%
Oxonia Active	0,1-0,25 kwas nadctowy, 0,5-1,0 nadtlenek wodoru, 0,1-0,25 kwas octowy; <i>Ecolab, USA</i>	związki utleniające	3%

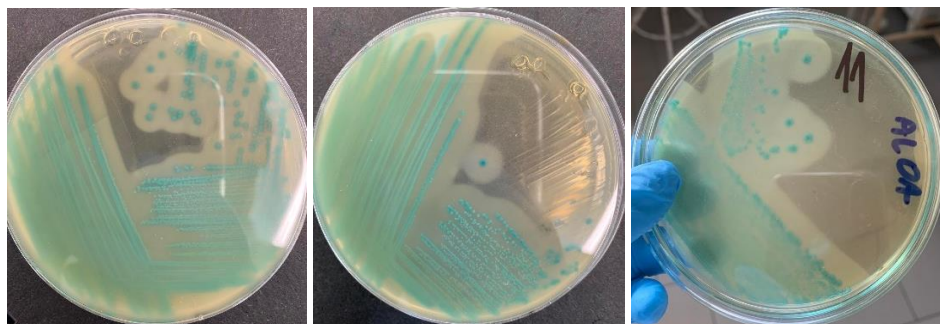
4.2.11. Statystyczna analiza wyników

Wpływ wybranych środków antymikrobiologicznych na proces formowania i eradykację biofilmu bakteryjnego analizowano przy pomocy testu ANOVA i testu Post-Hoc Tukeya. Istotność różnic określano przy $p \leq 0,05$. Dendrogramy podobieństwa konstruowano z zastosowaniem metody nieważonej grupowania parami ze średnią arytmetyczną (ang. *unweighted pair group method with arithmetic mean*, UPGMA).

5. WYNIKI

5.1. OKREŚLENIE PRZYNALEŻNOŚCI RODZAJOWEJ I GATUNKOWEJ IZOLATÓW

W okresie od czerwca do listopada 2019 r. pobrano łącznie 320 próbek z dwóch zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego. Pochodziły one z wymazów z linii technologicznych (łącznie 161), z wymazów z elementów i powierzchni niemających bezpośredniego kontaktu z przetwarzaną żywnością (łącznie 90), świeżych surowców i produktów (łącznie 59) oraz z produktów mrożonych (łącznie 10). Przy użyciu wstępnych, hodowlanych metod identyfikacji obecność bakterii z rodzaju *Listeria* wykryto w 54 próbkach (16,9%) (fotografia 1, tabela 21). Wyodrębniono z nich 92 izolaty, które w kolejnych etapach badań zostały poddane analizie molekularnej w celu potwierdzenia przynależności do gatunki *Listeria monocytogenes*.



Fot. 1. Hodowle bakteryjne *Listeria monocytogenes* na podłożu ALOA

Najczęściej skażone przez bakterie z rodzaju *Listeria* spp. były produkty mrożone. Bakterie wyizolowano z każdej badanej próbki. Na drugim miejscu były świeże warzywa, z których 1/3 zawierała pałeczki *Listeria* spp. W mniejszym stopniu skażone były powierzchnie zakładów produkcyjnych. Obecność pałeczek wykazano w 7,8-11,8 % pobranych wymazów.

Tabela 21. Liczba izolatów *Listeria* spp. uzyskanych z próbek pobranych na terenach zakładów przetwórczych

Charakterystyka próbki	Liczba próbek zawierających <i>Listeria</i> spp./całkowita liczba próbek (odsetek)
Mrożone produkty	10/10 (100%)
Świeże surowce i produkty	18/59 (30,5%)
Wymazy z linii technologicznych	19/161 (11,8%)
Pozostałe elementy i powierzchnie	7/90 (7,8%)
Σ	54/320 (16,9%)

5.2. RÓŻNICOWANIE SZCZEPÓW *L. MONOCYTOGENES* OD POZOSTAŁYCH *LISTERIA* SPP. METODĄ DUPEKS-PCR

W wyniku wstępnej identyfikacji z wykorzystaniem metod hodowlanych uzyskano 92 izolaty *Listeria* spp. Celem określenia przynależności gatunkowej poddano je badaniu metodą dupleks-PCR, które wykazało, że do gatunku *L. monocytogenes* należały 73 izolaty. Potwierdzenie przynależności stanowiła obecność dwóch prążków na żelu: rodzajowego (938 pz) oraz gatunkowego (702 pz). Na fotografii 2 przedstawiono wybrane podziały elektroforetyczne przeprowadzone po reakcji dupleks-PCR.



Fot. 2. Obraz żelu agarozowego po elektroforezie.

Opis ścieżek: M – marker wielkości 100-1000 pz, W – wzorzec *L. monocytogenes*, ścieżki od 1 do 71 – izolaty *Listeria* spp.

Z próbek, w których potwierdzono obecność *Listeria* spp., ponad połowa pochodziła z mrożonych produktów, a 1/3 z linii technologicznych. Ze świeżych warzyw wyizolowano 9,7% całkowitej puli izolatów (tabela 22).

Tabela 22. Liczba izolatów *L. monocytogenes* uzyskanych z próbek pobranych na terenach zakładów przetwórczych

Charakterystyka próbek	Numer izolatu	Liczba izolatów (odsetek)	Środowisko izolacji		
Świeże surowce i produkty	16, 20, 21, 22	7 (9,6%)	brokuł		
	66, 68, 71		pasternak		
Mrożone produkty	10, 27, 28, 29, 30	43 (58,9%)	kukurydza ziarno		
	4, 31, 32, 33, 34		brokuł		
	35, 36, 37, 38		brokuł		
	39, 40, 41, 42		marchew		
	43, 44, 45, 46		brokuł		
	47, 48, 49, 50		brokuł		
	51, 52, 53, 54		mieszanka z ryżem		
	55, 56, 57, 58		mieszanka warzyw		
	59, 60, 61, 62		brokuł		
	63, 64, 65, 67, 69		brokuł		
Wymazy z linii technologicznych	1, 2, 3	22 (30,1%)	podajnik – przed podajnikami kubełkowymi		
	5, 6, 7		podajnik do blanszownika		
	8, 9, 11		podajnik do blanszownika		
	12, 13, 14, 15, 17, 18, 19		podajnik 2 - krótszy		
	23, 24, 25, 26		podajnik kubełkowy		
	Pozostałe elementy i powierzchnie		70	1 (1,4%)	taśma inspekcyjna
					kratka za tunelem

5.3. OKREŚLENIE POKREWIEŃSTWA GENETYCZNEGO IZOLATÓW

W oparciu o wzory prążków uzyskane w reakcjach RAPD (fotografia 3) przy zastosowaniu programu FreeTree Ver. 0.9.1.50 i TreeView Ver. 1.6.6. sporządzono dendrogram (rycina 1), przedstawiający podobieństwo genetyczne badanych 73 izolatów.

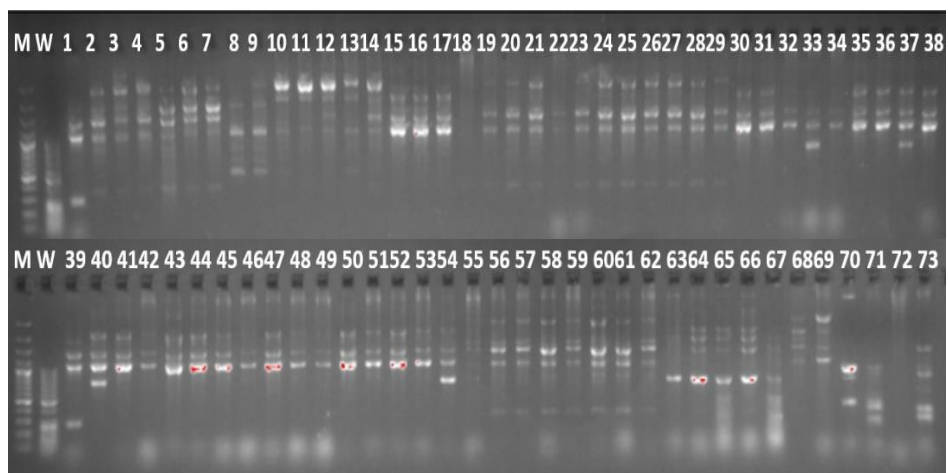
Analiza wyników reakcji RAPD-PCR ze starterem OPA-11 wykazała różnicowanie genetyczne między izolatami. Liczba zidentyfikowanych loci wynosiła 29, z czego wszystkie były polimorficzne. Amplifikacja ze starterem OPA-11 pozwoliła na uzyskanie od 2 (izolaty 19, 50 i 56) do 7 produktów reakcji (izolat 61). Długość produktów wynosiła od 225 pz (izolaty 68, 72 i 73) do 5800 pz (izolat 71).

Uzyskany dendrogram pozwolił na wyodrębnienie dwóch grup genetycznych izolatów. Do grupy pierwszej należały izolaty o numerach od 2 do 39, które przyporządkowano do szczepów o numerach od 1 do 9. Do drugiej należały pozostałe analizowane izolaty, które przyporządkowano do szczepów o numerach od 10 do 13.

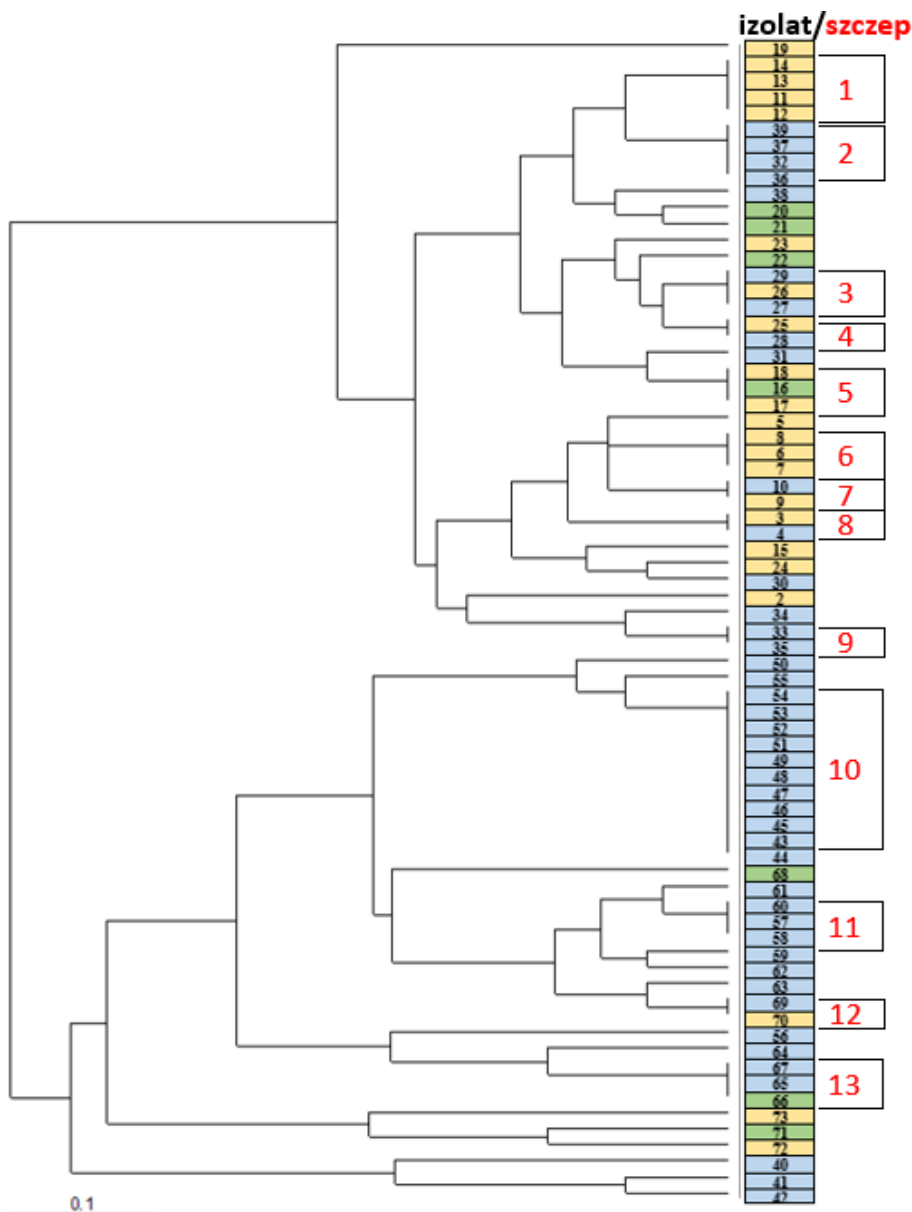
W pierwszej grupie wyróżniono dwie podgrupy i izolat 19 nie należący do żadnej z podgrup. W pierwszej podgrupie znajdowały się izolaty [11-14], [17, 18], [20, 21], [26, 27, 29], [32, 36,37, 39] oraz 22, 23, 31, 38 (w nawiasach kwadratowych izolaty identyczne). Stwierdzono, że izolaty należące do pierwszej grupy genetycznej pochodziły najczęściej z wymazów z linii produkcyjnych (51,3%), w drugiej kolejności z mrożonych produktów (38,4%), następnie ze świeżych surowców i produktów (10,3%).

Do drugiej podgrupy należały izolaty 2, [3,4], 5, [6-8], [9-10], 15, [30, 24], 34, [33-35]. Pozostałe stanowiły drugą główną grupę, w obrębie której izolaty zostały pogrupowane w cztery mniejsze podgrupy. Pierwszą podgrupę stanowiły izolaty 50, 55, [43-49, 51-54], 68, 61, [57, 58, 60], 59, 62, 63, [69, 70]. Do drugiej podgrupy należały izolaty: 56, 64, [65-67], do trzeciej podgrupy: 71, 72, 73, a do czwartej izolaty: 40, 41, 42. Izolaty należące do drugiej grupy genetycznej pochodziły głównie z mrożonych produktów (82,4%), następnie z wymazów z linii produkcyjnej i świeżych surowców i produktów (po 8,8%). Nie stwierdzono, aby dany izolat należał do więcej niż jednej grupy genetycznej.

Stwierdzono, że izolaty należące do szczepów 1 i 6 pochodziły wyłącznie z wymazów z linii produkcyjnej, natomiast izolaty należące do szczepów 2, 9, 10 i 11 pochodziły wyłącznie z mrożonych produktów i nie stwierdzono ich obecności w innych badanych próbkach. Szczepy 3, 4, 7, 8 i 12 obejmowały izolaty pochodzące z wymazów i mrozonek, co mogło sugerować, że bakterie *L. monocytogenes* obecne na powierzchniach zakładu przedostały się do mrozonek. W przypadku szczepu 5 izolaty pochodziły zarówno z wymazów ze środowiska zakładu, jak i świeżych surowców i produktów, na podstawie czego należy wnioskować, że doszło do transmisji bakterii z surowca do środowiska zakładu lub ze środowiska zakładu do produktu. Izolaty w obrębie szczepu 13 pochodziły z surowców i mrozonek, co wskazuje na możliwą transmisję *L. monocytogenes* z surowca do produktu.



Fot. 3. Wynik rozkładu elektroforetycznego uzyskany po reakcji RAPD, próbki od 1 do 73. Opis ścieżek: M – marker wielkości 50-1000 pz, W – wzorzec *L. monocytogenes*.



Ryc. 1. Dendrogram przedstawiający stopień genetycznego podobieństwa badanych izolatów (oznaczonych numerami) pochodzących z różnych środowisk: ■ - świeże surowce i produkty; ■ - wymazy z linii produkcyjnej; ■ - mrożone produkty

Analiza pokrewieństwa genetycznego pozwoliła na przyporządkowanie 73 izolatów *L. monocytogenes* do 41 szczepów, z których 13 obejmowało więcej niż jeden izolat identyczny genetycznie (tabela 23).

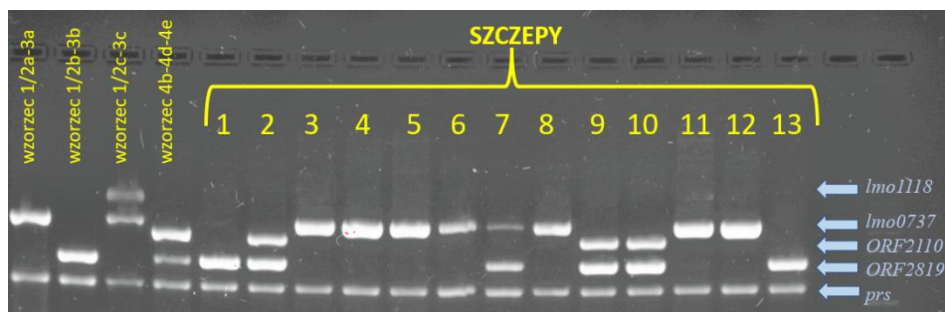
Tabela 23. Izolaty reprezentujące poszczególne szczepy

Numer szczepu	Izolaty	Środowisko izolacji wybranego izolatu
1	11, 12*, 13, 14	Wymaz z linii produkcyjnej
2	32, 36, 37*, 39	Świeże surowce i produkty
3	26*, 27, 29	Wymaz z linii produkcyjnej
4	25*, 28	Wymaz z linii produkcyjnej
5	16*, 17, 18	Świeże surowce i produkty
6	6, 7*, 8	Wymaz z linii produkcyjnej
7	9, 10*	Produkt mrożony
8	3, 4*	Produkt mrożony
9	33*, 35	Produkt mrożony
10	43, 44, 45, 46, 47, 48*, 49, 51, 52, 53, 54	Produkt mrożony
11	57*, 58, 60	Produkt mrożony
12	69*, 70	Produkt mrożony
13	65, 66*, 67	Świeże surowce i produkty

*izolat wybrany do dalszych testów, reprezentujący szczep

5.4. SEROGRUPOWANIE SZCZEPÓW BAKTERYJNYCH

W wyniku przeprowadzenia procedury opracowanej przez Doumitha i wsp. [2004] określono przynależność 13 szczepów *L. monocytogenes* do serogrup molekularnych. Okazało się, że ponad połowa należała do serotypu 1/2a-3a (serogrupa IIa), pozostałe do 1/2b-3b (serogrupa IIb) i 4b-4d-4e (serogrupa IVb) (rycina 2, tabela 24). Żaden ze szczepów nie należał do serogrupy IIc (serotyp 1/2c-3c). Analizując wyniki pod kątem źródła izolacji szczepów stwierdzono, że *L. monocytogenes* należące do serogrupy IIa najczęściej pochodziły z mrożonych produktów i wymazów z linii technologicznych, szczepy należące do serogrupy IIb wykrywano w produktach mrożonych, świeżych, jak i w wymazach z linii technologicznej, natomiast szczepy należące do grupy IVb pochodziły wyłącznie z produktów mrożonych (rycina 2).



Ryc 2. Wynik rozkładu elektroforetycznego po reakcji multiplex-PCR

Tabela 24. Wynik badania przynależności izolatów do grup serotypowych

Serogrupy	Serotypy	Liczba i odsetek szczepów	Numery szczepów i środowisko izolacji*
IIa	1/2a-3a	7 (54%)	3 (W) 4 (W) 5 (Ś) 6 (W) 8 (M) 11 (M) 12 (M)
IIb	1/2b-3b	3 (23%)	1 (W) 7 (M) 13 (Ś)
IVb	4b-4d-4e	3 (23%)	2 (M) 9 (M) 10 (M)

*M – mrożone produkty, Ś – świeże surowce i produkty, W – wymazy z linii produkcyjnej.

5.5. WYKRYWANIE GENÓW KODUJĄCYCH WYBRANE CZYNNIKI WIRULENCJI TECHNIKĄ MULTIPLEX PCR

W wyniku przeprowadzenia techniki multiplex PCR określono, że największy odsetek badanych szczepów (30,8%) wykazywał profil wirulencji B, tj. posiadał następujące geny kodujące czynniki wirulencji: *fbpA*, *hlyA*, *plcA*, *plcB*, *actA*, *inlB*, *iap*, *prfA*. Szczepy te pochodziły z próbek wyizolowanych z mrożonych produktów, świeżych surowców i produktów i wymazów z linii technologicznych (tabela 25).

Tabela 25. Występowanie genów kodujących wybrane czynniki wirulencji u badanych szczepów *L. monocytogenes*

Profil wirulencji	Geny kodujące czynniki wirulencji	Liczba i odsetek szczepów	Numery szczepów i środowisko izolacji*
A	<i>fbpA, hlyA, plcA, plcB, actA, inlB, iap, mpl, prfA</i>	3 (23,0%)	1 (W) 8 (M) 10 (M)
B	<i>fbpA, hlyA, plcA, plcB, actA, inlB, iap, prfA</i>	4 (30,8%)	2 (M) 5 (Ś) 6 (W) 11 (M)
C	<i>fbpA, hlyA, plcA, actA, inlB, iap, mpl, prfA</i>	2 (15,4%)	3 (W) 9 (M)
D	<i>fbpA, hlyA, plcA, plcB, actA, inlB, iap</i>	2 (15,4%)	7 (M) 13 (Ś)
E	<i>hlyA, plcA, plcB, actA, inlB, iap</i>	1 (7,7%)	4 (W)
F	<i>fbpA, hlyA, plcA</i>	1 (7,7%)	12 (M)

*M – mrożone produkty, Ś – świeże surowce i produkty, W – wymazy z linii produkcyjnej.

5.6. OKREŚLENIE MIC I MBC CZYNNIKÓW ANTYBAKTERYJNYCH Z WYKORZYSTANIEM METODY MIKROPŁYTKOWEJ

Wyniki doświadczenia wykazały zróżnicowaną wrażliwość badanych szczepów na działanie czynników antybakteryjnych. Stwierdzono, że największą wrażliwość na działanie bakteriofaga wykazywały szczepy o numerach 1-4 (zakres stężeń od 10^7 do 10^5 pfu·ml⁻¹), natomiast największą oporność szczepy o numerach 7-12 wyizolowane z mrozonek (stężenie 10^4 pfu·ml⁻¹). Najbardziej wrażliwe na działanie nizyny były szczepy o numerach 2, 3, 6 i 13 (zakres stężeń od 0,19% do 0,75%), natomiast bardziej odporne szczepy o numerach 9, 11 i 12 (wszystkie wyizolowane z mrozonek), dla których MIC wyniosło 1,25%. Na działanie lizozymu najbardziej wrażliwe były szczepy o numerach 2, 3, 4 i 6 (zakres stężeń od 1,9% do 6,25%), natomiast najbardziej odporne szczepy o numerach 8, 10 i 11 (stężenie 12,5%) – wszystkie pochodziły z mrozonek. Określono, że najbardziej wrażliwe na wszystkie badane związki były szczepy 2 i 3, natomiast najbardziej opornym był szczep nr 12 wyizolowany z mrożonki (tabela 26).

Tabela 26. MIC i MBC wybranych czynników antybakteryjnych

Numer szczepu (miejsce izolacji*)	Fag [pfu·ml ⁻¹]		Nizyna		Lizozym	
	MIC	MBC	MIC [%]	MBC [%]	MIC [%]	MBC [%]
1 (W)	10 ⁷	10 ⁶	0,38	0,38	6,25	6,25
2 (M)	10 ⁶	10 ⁶	0,19	0,38	3,75	3,75
3 (W)	10 ⁷	10 ⁶	0,10	0,19	3,75	1,9
4 (W)	10 ⁶	10 ⁶	0,38	0,38	3,75	1,9
5 (Ś)	10 ⁶	10 ⁵	0,38	0,19	3,75	3,75
6 (W)	10 ⁶	10 ⁵	0,19	0,19	1,9	1,9
7 (M)	10 ⁵	10⁴**	0,75	0,38	6,25	12,5**
8 (M)	10 ⁵	10 ⁴	0,75	0,75	12,5**	12,5
9 (M)	10⁴**	10 ⁴	1,25**	0,75	6,25	12,5
10 (M)	10 ⁵	10 ⁴	0,75	0,75	12,5	12,5
11 (M)	10 ⁵	10 ⁴	1,25	0,75	6,25	12,5
12 (M)	10 ⁴	10 ⁴	1,25	1,25**	12,5	12,5
13 (W)	10 ⁶	10 ⁵	0,19	0,19	6,25	6,25

*M – mrożone produkty, Ś – świeże surowce i produkty, W – wymazy z linii produkcyjnych

** MIC i MBC skuteczne w ograniczaniu wzrostu wszystkich szczepów

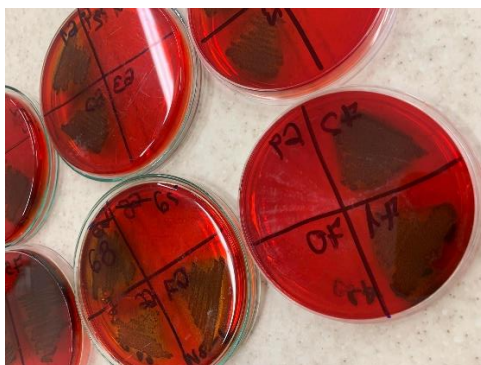
5.7. OKREŚLENIE ZDOLNOŚCI SZCZEPÓW *L. MONOCYTOGENES* DO TWORZENIA BIOFILMU BAKTERYJNEGO I WPŁYW RÓŻNYCH CZYNNIKÓW NA TEN PROCES

5.7.1. Zdolność do tworzenia biofilmu

W wyniku hodowli szczepów na agarze z czerwiecią Kongo określono, że wzrostem w postaci kolonii o bardzo czarnym, czarnym lub prawie czarnym zabarwieniem charakteryzowało się 6 z 13 szczepów (46,2%) (tabela 27, fotografia 4).

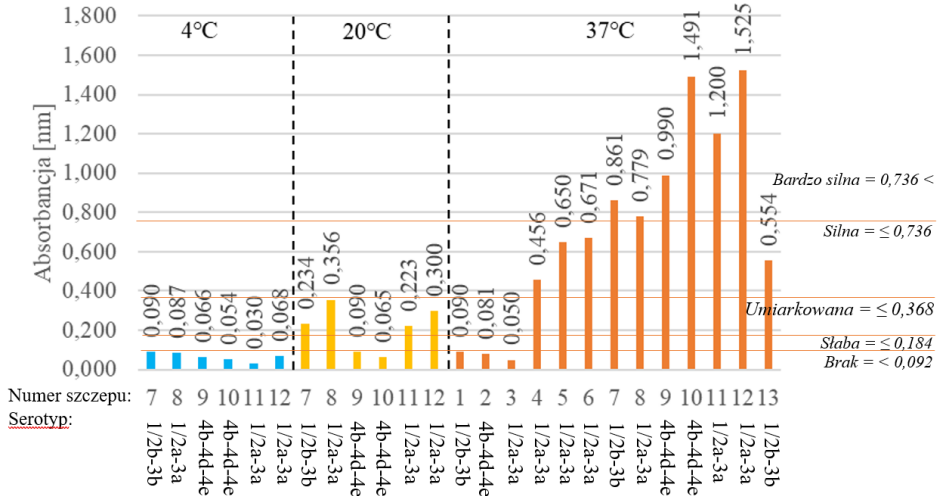
Tabela 27. Ocena zdolności do tworzenia biofilmu określana na podstawie testu CRA

Zabarwienie kolonii	Liczba izolatów (odsetek)	Numery szczepów	Środowisko izolacji
Bardzo czarny	3/13 (23,1%)	9, 11, 12	mrożone produkty
Czarny	1/13 (7,7%)	7	mrożone produkty
Prawie czarny	2/13 (15,4%)	8, 10	mrożone produkty



Fot. 4. Wyniki hodowli izolatów na podłożu CRA

Zdolność do tworzenia biofilmu metodą z wykorzystaniem fioletu krystalicznego określano w różnych temperaturach odpowiadających warunkom chłodniczym (4°C), takim, w których bakterie wykazują zdolność do ruchu (20°C) i optymalnym (37°C). Stwierdzono, że w warunkach optymalnych 6 szczepów wykazywało bardzo silne zdolności do tworzenia biofilmu (nr 7-12) i to właśnie one zostały wytypowane do dalszych etapów doświadczenia polegającego na ocenie zdolności do wytwarzania biofilmu w 4°C i 20°C. Wyniki badań udowodniły, że w warunkach chłodniczych szczepy nie tworzyły biofilmu, natomiast w 20°C wykazywały zróżnicowane zdolności formowania tej struktury (rysunek 3). Obie zastosowane metody wskazały bardzo silną zdolność do tworzenia biofilmu tych samych 6 szczepów *L. monocytogenes*. Połowa z nich należała do serotypu 1/2a-3a, dwa do 4b-4d-4e, a jeden do 1/2b-3b.

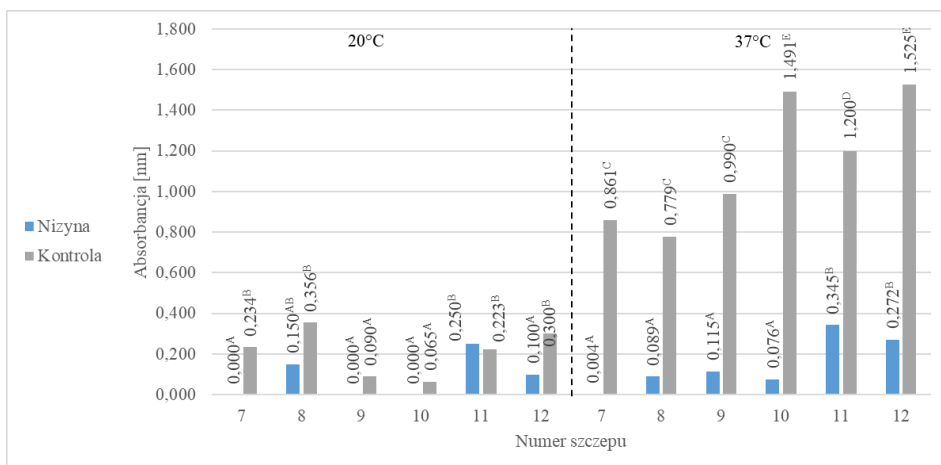


Rys. 3. Zdolność szczepów *L. monocytogenes* do tworzenia biofilmu w różnych temperaturach (metoda z wykorzystaniem fioletu krystalicznego)

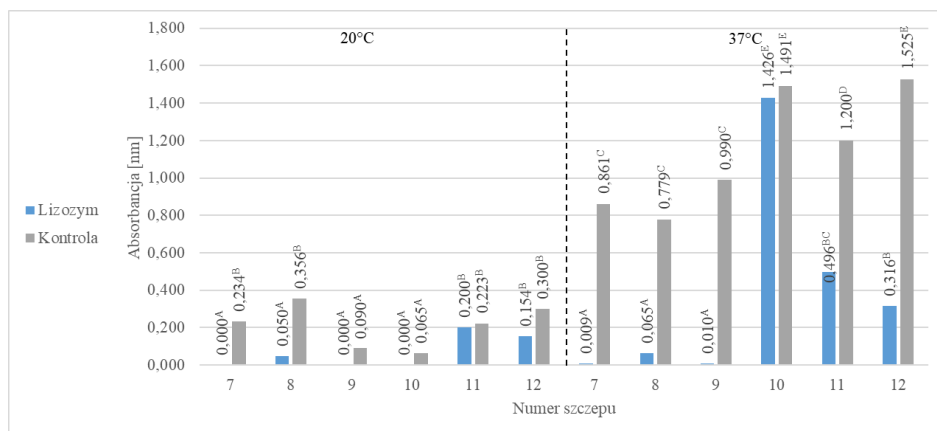
5.7.2. Wpływ nizyny, lizozymu i bakteriofaga na wytwarzanie biofilmu

Wyniki oceny wpływu substancji antybakteryjnych na formowanie biofilmu wykazały, że każda z nich hamowała ten proces zarówno w temperaturze 37°C, jak i w 20°C (rysunki 4-6). Wszystkie badane szczepy wykazywały silną zdolność do tworzenia biofilmu w 37°C (wartość absorbancji wynosiła od 0,861 do 1,525 dla szczepów od 7 do 12). Szczepy o numerach 7 i 10 wykazywały znacznie ograniczone zdolności do tworzenia biofilmu w obecności nizyny zarówno w 37°C jak i 20°C ($p \leq 0,05$). Szczep numer 11 wykazał zwiększoną w stosunku do pozostałych oporność na działanie nizyny (wartość absorbancji dla szczepu 11 wynosiła 0,250 w 37°C oraz 0,345 w 20°C) (rysunek 4).

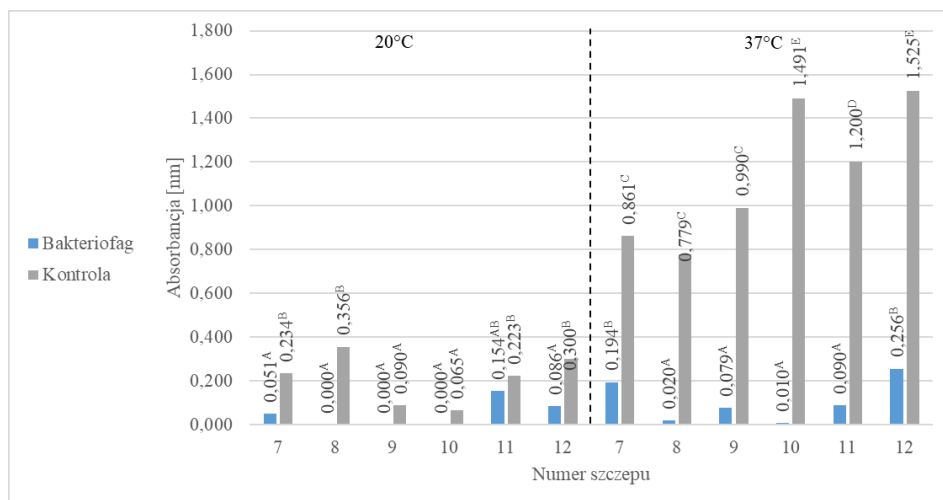
Badane szczepy wykazywały zróżnicowaną wrażliwość na działanie lizozymu w różnych warunkach temperaturowych (rysunek 5). W przypadku szczepów o numerach 7, 8 i 9 lizozym skutecznie ograniczał wytwarzanie biofilmu we wszystkich warunkach temperaturowych (szczepy o numerach 9 i 10 wykazywały niską zdolność do wytwarzania biofilmu w 20°C). Szczep numer 10 nie wykazywał wrażliwości na działanie lizozymu (tworzył biofilm na poziomie porównywanym z kontrolą w warunkach 37°C, $p \leq 0,05$).



Rys. 4. Wpływ nizyny na wytwarzanie biofilmu w różnych temperaturach



Rys. 5. Wpływ lizozymu na wytwarzanie biofilmu w różnych temperaturach

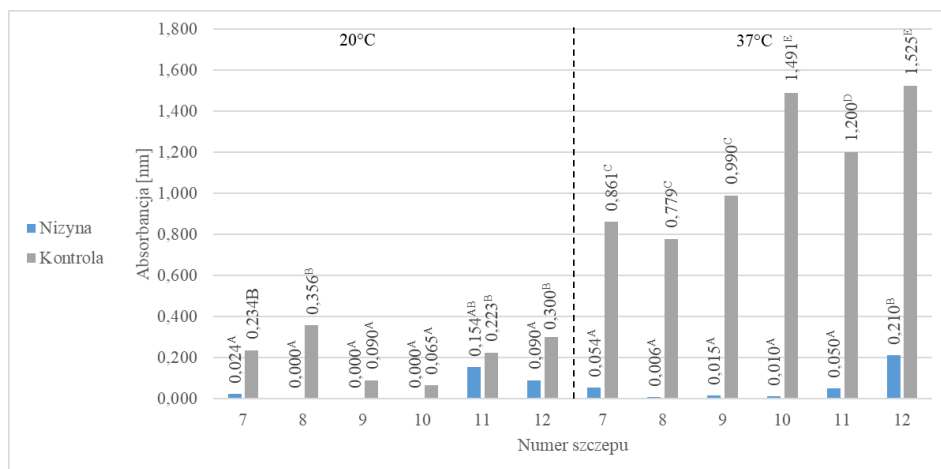


Rys. 6. Wpływ bakteriofaga na wytwarzanie biofilmu w różnych temperaturach

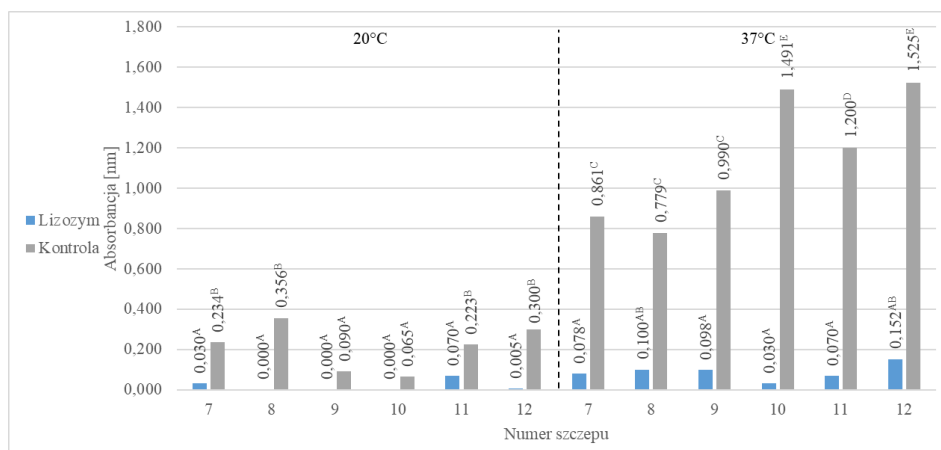
Stwierdzono, że bakteriofag szczególnie skutecznie wpływał na ograniczenie rozwoju biofilmu szczepów 8, 9 i 10 w temperaturze 20°C. W przypadku temperatury 37°C stwierdzono, że bakteriofag istotnie ograniczał rozwój biofilmu wszystkich badanych szczepów ($p \leq 0,05$).

5.7.3. Ocena wpływu nizyny, lizozymu i bakteriofaga na eradykację wytworzonego wcześniej biofilmu

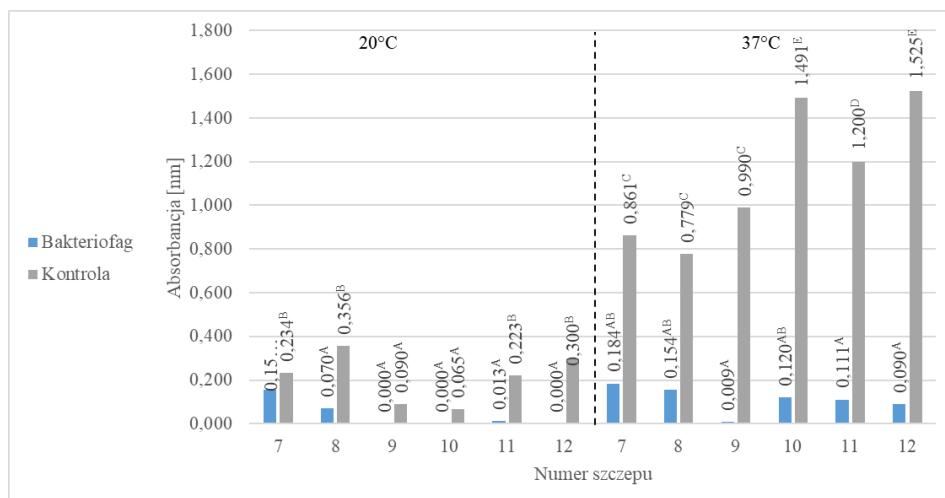
W wyniku oceny wpływu wybranych substancji antybakteryjnych: nizyny, lizozymu i bakteriofaga stwierdzono, że wszystkie substancje wykazywały wpływ na eradykację wytworzonego wcześniej biofilmu, zarówno w warunkach 37°C jak i 20°C (rysunki 7-9). W przypadku nizyny obserwowano eradykację biofilmu szczepów 8, 9 i 10, natomiast szczep 11 w 20°C charakteryzował się zwiększoną opornością na działanie nizyny niż w przypadku tego samego szczepu w 37°C (wartości absorbancji wynosiły 0,000 i 0,006 dla szczepu 8, 0,000 i 0,015 dla szczepu 9, 0,000 i 0,010 dla szczepu 10 w 20°C i 37°C oraz 0,154 i 0,050 dla szczepu 11 w 20°C i 37°C). Szczep 12 wykazywał stosunkowo zwiększoną oporność na działanie nizyny i lizozymu w warunkach 37°C (wartości absorbancji wynosiły 0,210 dla próbki z nizyną i 0,152 dla próbki z lizozymem). Stwierdzono również, że bakteriofag skutecznie eradykował biofilm w przypadku wszystkich badanych szczepów we wszystkich analizowanych warunkach temperaturowych, jednak nie stwierdzono istotnych różnic w eradykacji biofilmu pomiędzy poszczególnymi szczepami w obu warunkach temperaturowych (zakres absorbancji wynosił od 0,009 do 0,184 w obu badanych warunkach temperaturowych).



Rys. 7. Wpływ nizyny na biofilm wytworzony w różnych temperaturach



Rys. 8. Wpływ lizozymu na biofilm wytworzony w różnych temperaturach



Rys. 9. Wpływ bakteriofaga na biofilm wytworzony w różnych temperaturach

5.8. OCENA ANTYBIOTYKOOPORNOŚCI SZCZEPÓW *L. MONOCYTOGENES*

Antybiotykiem, na który badane szczepy najczęściej wykazywały oporność był meropenem (10 z 13 szczepów) (tabela 28). Szczepy najczęściej wykazywały profil oporności F (30,7%), tzn. wykazywały oporność na wszystkie zastosowane antybiotyki (tabela 29).

Tabela 28. Oporność szczepów *L. monocytogenes* na antybiotyki

Antybiotyk	Zawartość antybiotyku w krążku	Wartość graniczna strefy zahamowania wzrostu (mm)		Liczba szczepów opornych (odsetek)
		S ≥	R <	
Penicylina benzylowa	1 µg	13	13	9 (69,2%)
Ampicylina	2 µg	16	16	9 (69,2%)
Meropenem	10 µg	26	26	10 (76,9%)
Erytromycyna	15 µg	25	25	6 (46,2%)
Trimetoprim sulfametoksazol	1,25-23,75 µg	29	29	4 (30,8%)

Tabela 29. Profile oporności szczepów *L. monocytogenes*

Profil oporności	Lekooporność	Numery szczepów (środowisko izolacji*)	Liczba szczepów (odsetek)
A	W: PEN, AMP, E, STX O: MEM	3 (W), 7 (M), 9 (M)	3 (23,1%)
B	W: AMP, MEM, STX O: PEN, E	1 (W)	1 (7,7%)
C	W: MEM, E, STX O: PEN, AMP	2 (M), 6 (W)	2 (15,4%)
D	W: E, STX O: P, AM, MEM	4 (M), 5 (Ś)	2 (15,4%)
E	W: PEN, STX O: AMP, MEM, E	8 (M)	1 (7,7%)
F	W: --- O: PEN, AMP, MEM, E, STX	10 (M), 11 (M), 12 (M), 13 (Ś)	4 (30,7%)

W – szczepy wrażliwe, O – szczepy odporne, P - penicylina, AM - ampicylina, MEM - meropenem, E - erytromycyna, STX- trimetoprim-sulfametoksazol

*M – mrożone produkty, Ś – świeże surowce i produkty, W – wymazy z linii produkcyjnej.

5.9. OKREŚLENIE WPLYWU WYBRANYCH ŚRODKÓW DEZYNFEKCYJNYCH

W wyniku badania wpływu wybranych środków dezynfekcyjnych określono, że MIC i MBC dla badanych szczepów *L. monocytogenes* (tabela 30) wyniosły odpowiednio: Tesol 0,5% i 0,5%; Tesol ME 0,016% i 0,016%; Alusol 0,5% i 0,5%; Barsan 0,16% i 0,16%; Deptal 0,25% i 0,25%, Deptil 0,063% i 0,063%, Oxonia 0,016% i 0,016% oraz Topax 0,031% i 0,031% (tabela 35). Za najskuteczniejsze środki dezynfekcyjne uznano Tesol ME oraz Oxonia Active, z uwagi na najniższe stężenia MIC i MBC. Środkami, które wykazywały działanie przeciwdrobnoustrojowe w najwyższych stężeniach (co wskazuje na niską podatność badanych szczepów) były Tesol i Alusol. Szczepami najbardziej wrażliwymi na działanie środków dezynfekcyjnych były szczepy o numerach 2, 4 i 10, które wykazywały wrażliwość na co najmniej 3 z 8 środków (37,5%) izolowane były z mrożonych produktów i wymazów z linii technologicznych. Szczepami najbardziej opornymi na działanie środków dezynfekcyjnych były szczepy o numerach 1, 8 i 9, które wykazywały oporność na co najmniej 4 z 8 środków (50%) i izolowane były najczęściej z mrożonych produktów i wymazów w linii technologicznych.

Tabela 30. MIC [%] i MBC [%] wybranych środków dezynfekcyjnych

Numer szczepu (miejsce izolacji*)	Chlorowce				Kwasy nieorganiczne	Czwartorzędowe związki amoniowe	Alkohole	Związki utleniające
	Tesol	Tesol ME	Deptal CMC	Topax 66				
	MIC/MBC	MIC/MBC	MIC/MBC	MIC/MBC				
1 (W)	0,5/0,5	0,016/0,016	0,25/0,25	0,004/0,004	MIC/MBC 0,25/0,25	MIC/MBC 0,008/0,008	MIC/MBC 0,063/0,063	MIC/MBC 0,008/0,008
2 (M)	0,5/0,5	0,016/0,008	0,063/0,063	0,0031/0,0031	0,5/0,25	0,008/0,008	0,0063/0,0063	0,016/0,008
3 (W)	0,25/0,25	0,008/0,008	0,25/0,025	0,031/0,0031	0,25/0,25	0,016/0,008	0,063/0,063	0,016/0,008
4 (W)	0,25/0,25	0,016/0,008	0,25/0,25	0,031/0,031	0,25/0,13	0,016/0,008	0,063/0,063	0,008/0,008
5 (Ś)	0,5/0,25	0,016/0,016	0,25/0,25	0,004/0,002	0,25/0,13	0,008/0,008	0,063/0,0063	0,016/0,016
6 (W)	0,25/0,25	0,008/0,004	0,25/0,25	0,004/0,002	0,25/0,25	0,008/0,008	0,0063/0,0063	0,016/0,016
7 (M)	0,5/0,25	0,008/0,004	0,63/0,63	0,031/0,031	0,5/0,25	0,016/0,016	0,063/0,0063	0,016/0,016
8 (M)	0,5/0,5	0,008/0,004	0,25/0,25	0,031/0,031	0,25/0,13	0,016/0,016	0,063/0,063	0,008/0,008
9 (M)	0,5/0,5	0,016/0,008	0,25/0,25	0,031/0,031	0,5/0,25	0,008/0,008	0,063/0,063	0,008/0,008
10 (M)	0,25/0,25	0,016/0,008	0,063/0,063	0,031/0,0031	0,25/0,13	0,016/0,008	0,063/0,063	0,016/0,008
11 (M)	0,25/0,25	0,016/0,008	0,063/0,063	0,004/0,004	0,5/0,5	0,016/0,008	0,063/0,0063	0,016/0,016
12 (M)	0,5/0,25	0,008/0,008	0,063/0,063	0,004/0,002	0,25/0,25	0,016/0,016	0,0063/0,0063	0,016/0,016
13 (W)	0,5/0,5	0,008/0,004	0,25/0,13	0,004/0,002	0,5/0,5	0,008/0,008	0,063/0,063	0,016/0,008

Legenda: tym samym kolorem zaznaczono wartości MIC i MBC danego dezynfektanta skutecznego w ograniczeniu wzrostu wszystkich badanych szczepów bakteryjnych, *M – mrożone produkty, Ś – świeże surowce i produkty, W – wymazy z linii produkcyjnych.

6. DYSKUSJA

Z uwagi na powszechną obecność w środowisku i rosnącą liczbę rejestrowanych przypadków listeriozy, pałeczki *L. monocytogenes* są stałym przedmiotem zainteresowania środowisk naukowych na całym świecie. Bakterie te izoluje się m.in. z gleby, ścieków, kiszzonek dla zwierząt oraz wody, a za główny wektor ich transmisji do organizmu człowieka uznaje się skażone produkty spożywcze zarówno pochodzenia roślinnego, jak i zwierzęcego. Bakterie *L. monocytogenes* mogą znaleźć się w środowisku zakładów przetwórczych poprzez surowce (np. mleko, mięso, owoce, warzywa), a także personel nie przestrzegający zasad higieny i dezynfekcji, a następnie w wyniku procesów technologicznych rozprzestrzeniają się w zakładach [Shanta i Gopal, 2014]. Powierzchnie taśm produkcyjnych i urządzeń wchodzących w skład linii technologicznych stanowią doskonałe miejsce bytowania komórek bakteryjnych tworzących biofilm, który z kolei przyczynia się do krzyżowego skażenia produktów [Leong i wsp., 2017; Linke i wsp., 2014; Rodríguez-López i wsp., 2018]. Pałeczki *L. monocytogenes*, które kolonizują środowisko zakładów przetwórczych i wytwarzają biofilm bakteryjny często wykazują zdolność do nabywania oporności na powszechnie stosowane środki dezynfekcyjne i antybiotyki, co czyni je szczególnie problematycznymi dla przetwórców i niebezpiecznymi dla konsumentów. Przestrzeganie standardów higieny opisanych w Wytycznych Dobrej Praktyki Higienicznej i Produkcyjnej sprzyja ograniczeniu ryzyka skażenia, jednak w obliczu szczególnie niebezpiecznej bakterii, zdolnej do nabywania oporności na substancje antymikrobiologiczne i formowania biofilmu, może okazać się niewystarczające [Camargo i wsp., 2017; Jordan i wsp., 2018].

W badaniach własnych potwierdzono występowanie bakterii z rodzaju *Listeria* w środowisku zakładów przetwórczych. Wyizolowano je z 16,9% próbek świeżych surowców, mrożonych produktów, z wymazów z linii technologicznych i pozostałych elementów i powierzchni, które nie miały bezpośredniego kontaktu z przetwarzaną żywnością. W wyniku wstępnej identyfikacji z wykorzystaniem metod hodowlanych do rodzaju *Listeria* zaliczono 92 izolaty, natomiast zastosowanie metod molekularnych pozwoliło na przyporządkowanie 73 z nich (79,3%) do gatunku *L. monocytogenes*. Zbliżone wyniki uzyskała Kropiewska [2019] analizując próbki pochodzące ze środowiska zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego oraz rybnego wykazała, że 81,8% pozyskanych izolatów *Listeria* spp. należało do gatunku *L. monocytogenes*. Ponniah i wsp. [2010] wykazał, że gatunek *L. monocytogenes* stanowił 70,0% izolatów wyosobnionych z próbek warzyw, pobranych w marketach i na targowiskach w Malezji, natomiast w badaniach Jamali i wsp. [2013] wskazują aż 80,8% izolatów jako *L. monocytogenes* pochodzących z sałatek warzywnych i warzyw zakupionych na targowiskach w Iranie. Odsetek izolatów wskazuje na wysoką częstość występowania pałeczek w żywności na całym świecie, szczególnie w przypadku produktów pochodzenia roślinnego, takich jak sałatki

warzywne czy surowe warzywa. Żywność typu RTE (m.in. sałatki) stanowi potencjalny wektor transmisji bakterii do organizmu człowieka, z uwagi gotowość do spożycia bez dalszej obróbki. W badaniach własnych izolaty pochodzące z mrożonych produktów stanowiły aż 58,9% wszystkich pozyskanych izolatów *Listeria* spp., z wymazów z linii technologicznych 30,1%, ze świeżych surowców i produktów 9,6%, a z wymazów niemających bezpośredniego kontaktu z przetwarzaną żywnością 1,4%. Analiza pokrewieństwa izolatów wykazała, że na terenie zakładu najczęściej dochodziło do skażenia krzyżowego gotowego produktu (w tym przypadku mrożonek). Za główny wektor zakażenia wskazać należy świeże surowce, za pośrednictwem których chorobotwórcze bakterie rozprzestrzeniły się na terenie obu monitorowanych obiektów. Powierzchnie niemające bezpośredniego kontaktu z przetwarzaną żywnością stanowią potencjalny rezerwuuar pałeczek *L. monocytogenes* w obrębie zakładów, ponieważ nie podlegają rygorystycznym zasadom dezynfekcji, a stwarzają dogodne warunki do wzrostu i rozwoju bakterii, poprzez dostęp do materii organicznej pochodzącej z przetwarzanych surowców. Montero i wsp. [2015] w swoich badaniach wskazują na obecność *L. monocytogenes* w 27,8% próbek mrożonek warzywnych i zaledwie 1,9% próbek produktów typu RTE, podobnie jak w badaniach własnych. Na podstawie przeprowadzonych badań należy stwierdzić, że zabiegi czyszczenia i dezynfekcji surowców roślinnych nie są wystarczające, aby skutecznie ograniczyć transmisję *L. monocytogenes*. Badania przeprowadzone przez Fallah i wsp. [2013] oraz Kropiewską [2019] wskazują, że procedury dezynfekcji w monitorowanych przez nich obiektach prawdopodobnie również nie były wystarczająco skuteczne. Można zatem wnioskować, iż monitoring mikrobiologiczny prowadzony w zakładach przetwórczych może stanowić skuteczne narzędzie w ustaleniu prawdopodobnych źródeł zagrożenia mikrobiologicznego przetwarzanych produktów spożywczych. Konieczne jest także systematyczne badanie cech fenotypowych i genotypowych *L. monocytogenes* oraz kontrola wpływu różnych czynników na te bakterie, co umożliwi wdrożenie skuteczniejszych metod kontroli ich występowania w żywności.

Ponad 90% przypadków listeriozy u ludzi wywołują serotypy 1/2a, 1/2b oraz 4b, spośród których 1/2a i 1/2b są najczęściej izolowane z żywności, a 4b z przypadków klinicznych [Tamburro i wsp., 2010; Vanegas i wsp., 2012; Kwong i wsp., 2016; Toledo i wsp., 2018]. W badaniach własnych wykazano, że ponad połowa (54%) szczepów *L. monocytogenes* należała do serotypu 1/2a-3a, pozostałe do 1/2b-3b (23%) i 4b-4d-4e (23%). Serotypy przyporządkowano do serogrup, odpowiednio IIa, IIb i IVb. Szczepy w obrębie serogrup IIa i IIb pochodziły zarówno z produktów mrożonych, jak i świeżych surowców i produktów oraz z wymazów z linii technologicznych. W związku z czym należy wnioskować, że źródłem skażenia bakteriami należącymi do serogrup IIa i IIb były surowce roślinne. Serogrupę IVb stanowiły wyłącznie szczepy pochodzące z próbek mrożonych produktów, co może wskazywać na występowanie tych

patogenów w środowisku zakładów i zakażenie krzyżowe produktów. Montero i wsp. [2015] oraz Jamali i wsp. [2013] dowiedli, że większość (odpowiednio, 48,0% i 61,9%) szczepów pochodzących z próbek surowych warzyw należała do serogrupy IIa. Uwzględniając rezultaty badań własnych oraz cytowanych autorów wnioskować należy, że *L. monocytogenes* obecne w próbkach żywności należały najczęściej do serogrupy IIa, do której należy serotyp 1/2a, uznawany za najczęściej występujący w żywności. Żaden ze szczepów objęty badaniami własnymi nie należał do serogrupy IIc (serotyp 1/2c-3c), co jest zgodne z wynikami uzyskanymi przez Tamburro i wsp. [2010]. Serotypy 1/2c i 1/2b w próbkach produktów spożywczych identyfikuje się stosunkowo rzadko. Istotnym zagrożeniem jest natomiast serotyp 4b (należący do serogrupy IVb), który najczęściej jest czynnikiem etiologicznym listeriozy u ludzi [Domenech i wsp., 2015]. Na podstawie zestawionych wyników można wnioskować, że serotypy *L. monocytogenes* wyizolowane ze środowiska zakładów przetwórczych, świeżych surowców i produktów, stanowią potencjalne zagrożenie dla zdrowia lub życia konsumentów.

Wysoka patogenność bakterii jest ściśle skorelowana z występowaniem określonych genów wirulencji [Maury i wsp., 2017; Poimenidou i wsp., 2018]. Dla procesu patogenezy *L. monocytogenes* kluczowe są geny znajdujące się w obrębie tzw. wyspy patogenności (LIPI; *Listeria pathogenicity Island*), do których należą: *prfA*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *actA*, *mpl*, *hpt*, *inlA*, *inlB*, *inlC*. W toku przeprowadzonych badań stwierdzono, że największy odsetek badanych szczepów (30,8%) posiadał następujące geny kodujące czynniki wirulencji: *fbpA*, *hlyA*, *plcA*, *plcB*, *actA*, *inlB*, *iap*, *prfA* i pochodził z próbek izolowanych z mrożonych produktów, świeżych surowców i produktów i wymazów z linii technologicznych. Jednocześnie stwierdzono, że 23,0% badanych szczepów posiadało wszystkie geny kodujące czynniki wirulencji. Skowron i wsp. [2018] oraz Chen i wsp. [2018] wykazali, że wszystkie badane przez nich szczepy posiadają geny kluczowe w procesie patogenezy. Gelbíčova i Karpíšková [2012] wskazały natomiast, że u badanych szczepów *L. monocytogenes* obecne były następujące geny wirulencji: *actA*, *hlyA*, *inlA*, *inlB*, *plcA*, *plcB*, *prfA*. W badaniach przeprowadzonych przez Das i wsp. [2013] stwierdzono, że badane szczepy posiadały geny *actA*, *hlyA*, *iap*, *mpl*, *plcA*, *prfA*. Skowron i wsp. wskazuje, że 11,1% badanych szczepów nie posiada genów *fbpA* i *mpl*. Gen *fbpA* koduje ekspresję genów *inlB* i *hlyA* i bierze udział w procesie zapobiegania rozpoznania patogenu przez system immunologiczny gospodarza. Gen *mpl* odpowiedzialny jest za aktywację białka *plcB*, które wspomaga lizę błony pęcherzyka fagotycznego.

Zakażenie *L. monocytogenes* zachodzi etapowo i obejmuje: adhezję i wnikanie do komórek, namnażanie, przenikanie do innych komórek i rozprzestrzenianie się w organizmie gospodarza. Obecność genów wirulencji umożliwia proces patogenezy, poprzez ich funkcję regulatorową, ujawniającą się na różnych etapach tego procesu. Kluczową rolę posiada przede wszystkim gen *prfA*, który wpływa na ekspresję *actA*, *hlyA*, *inlA* oraz *inlB*, *plcA* i *plcB*, *mpl*

[Tirumalai i Prakash, 2012; Poimenidou i wsp., 2018]. W przypadku stwierdzenia obecności tego genu, można wnioskować, że szczepy posiadały m.in. zdolność do adhezji, ruchu czy wnikania do komórek gospodarza. W badaniach własnych obecność genu *prfA* stwierdzono u niemal 70% badanych szczepów, w większości w mroźkach.

Istotnym czynnikiem zwiększającym ryzyko wtórnego skażenia żywności jest zdolność pałeczek *L. monocytogenes* do formowania biofilmu. Struktura biofilmu wpływa na zwiększenie oporności bakterii na działanie czynników zewnętrznych, co sprawia, że wprowadzane na terenach zakładów przetwórczych zasady mycia i dezynfekcji bardzo często pozostają nieskuteczne. Zdolność do tworzenia biofilmu zależna jest od warunków środowiskowych (charakterystyki podłoża, temperatury czy dostępności składników odżywczych), ale również właściwości danego szczepu czy obecności innych mikroorganizmów [Koreňová i wsp., 2016]. Co ciekawe ograniczony dostęp do składników odżywczych sprzyja rozwojowi biofilmów [Russo i wsp., 2018].

W badaniach własnych zdolność do tworzenia biofilmu w warunkach optymalnych do wzrostu bakterii (37°C), warunki, w których bakterie wykazują zdolność do ruchu (20°C) oraz warunki przechowalnicze żywności (4°C) przeprowadzono z wykorzystaniem pożywki agarowej z czerwienią Kongo oraz fioleto krystalicznego (metoda mikro płytkowa). Obie z nich wykazały, że 46,2% badanych szczepów charakteryzowało się silną i bardzo silną zdolnością do tworzenia biofilmu w warunkach optymalnych. Nie stwierdzono natomiast formowania biofilmu przez badane szczepy w warunkach przechowalniczych. Bonsaglia i wsp. [2014] przeprowadzili badania nad formowaniem biofilmu przez szczepy *L. monocytogenes*, pochodzące z produktów mlecznych, warzyw i środowiska zakładów przetwórstwa żywności, na różnych powierzchniach i w różnych warunkach temperaturowych. Stwierdzono, że szczepy tworzyły biofilm na takim samym poziomie w przypadku zarówno 4°C jak i 20°C. Jedynie 6,2% badanych szczepów wykazało silną zdolność do formowania biofilmu w obu wymienionych warunkach temperaturowych. Moltz i wsp. [2005] przeprowadzili badania nad wpływem różnych warunków wzrostowych (w tym temperaturowych: 4°C, 20°C i 37°C), w wyniku których stwierdzili, że temperatura inkubacji wpływa nie tylko na szybkość powstawania biofilmu, ale również na stopień przytwierdzenia komórek. Russo i wsp. [2018] udowodnili, że rodzaj zastosowanej pożywki i powierzchnia wykorzystanego nośnika (np. polistyren, szkło, stal nierdzewna) również wpływa na zdolność do formowania biofilmu. W badaniach własnych stwierdzono, że ponad 30% badanych szczepów wykazywało umiarkowaną zdolność do tworzenia biofilmu w warunkach 20°C. Różnice w uzyskanych wynikach może wynikać z różnic genotypowych i właściwości badanych izolatów.

Celem określenia wpływu wybranych czynników antybakteryjnych na proces formowania i eradykację wcześniej wytworzonego biofilmu sprawdzano wpływ nizyny, lizozymu i bakteriofaga Listex™ P-100 (dla których

wcześniej określono MIC i MBC wobec wszystkich szczepów) w optymalnych warunkach temperaturowych (37°C) oraz w takich, w których bakterie wykazują zdolność do ruchu (20°C). Stwierdzono, że każdy w zastosowanych czynników działał hamująco na proces formowania biofilmu i eradykację wcześniej wytworzonego biofilmu w analizowanych warunkach temperaturowych. Poszczególne szczepy wykazywały nieznacznie ograniczone zdolności do tworzenia biofilmu w połączeniu z niziną, lizozymem lub bakteriofagiem. Podobną zależność zaobserwowano w przypadku badania eradykacji biofilmu bakteryjnego. Podobne wyniki uzyskali badacze, którzy na przestrzeni lat prowadzili badania nad wpływem lizozymu [Hughey i wsp., 1989], nizyny [Van Schaik i wsp., 1999] i bakteriofaga [Denes i Wiedmann, 2014]. Gumulya i wsp. [2011] badali wpływ m.in. bakteriofaga, nizyny i lizozymu na ograniczenie wzrostu *L. monocytogenes* w próbkach suszonych kiełbas w wyniku czego stwierdzono bakteriostatyczny wpływ nizyny i lizozymu oraz bakteriobójczy wpływ bakteriofaga. Zebrane wyniki pozwalają jednak wnioskować, że zastosowane czynniki antybakteryjne istotnie przyczyniły się do ograniczania biofilmu *L. monocytogenes* w większości badanych przypadków i mogą stanowić potencjalną metodą zmniejszania ryzyka skażenia żywności.

Zjawisko antybiotykooporności jest coraz częściej obserwowane we współczesnej medycynie i weterynarii. Allen i wsp. [2016] jako możliwe przyczyny powstawania antybiotykooporności wskazuje horyzontalny transfer genów oporności, indukowanie mechanizmów odpowiedzi na subletalne stężenie czynników wpływających na wzrost bakterii oraz nabywanie oporności poprzez stosowanie tych samych antybiotyków przez długi czas. Antybiotykooporne szczepy *L. monocytogenes* (ABR *L. monocytogenes*) powstają w wyniku powstawania mutacji lub nabywania ruchomych elementów genetycznych i plazmidów [Bertsch i wsp., 2014]. W badaniu uwzględniono antybiotyki zgodnie z rekomendacjami EUCAST [2021] takie jak: ampicylina, erytromycyna, penicylina, meropenem i trimetoprim - sulfametoksazol. Khen i wsp. [2015] w swoich badaniach stwierdzili występowanie wśród wielu szczepów oporności na ampicylinę. Badania na przestrzeni ostatnich lat dowodzą również pojawienia się w środowiskach zakładów przetwórstwa żywności szczepów opornych na działanie takich antybiotyków jak: klindamycyna, tetracyklina, trimetoprim, florfenikol, kwas nalidyksowy, erytromycynę, streptomycynę, kanamycynę, chloramfenikol czy ciprofloksacynę [Adzitey i wsp., 2013; Bertsch i wsp., 2014; Jamali i wsp., 2013; Jamali i wsp., 2014; Wang i wsp., 2017]. W badaniach własnych wykazano, że 30,7% szczepów charakteryzowało się opornością na wszystkie zastosowane antybiotyki. Najwięcej szczepów wykazało oporność na działanie meropenemu (76,9%), w następnej kolejności penicyliny benzylowej i ampicyliny (po 69,2%), erytromycyny (46,2%) i trimetoprimu – sulfametoksazolu (30,8%). Lee i wsp. [2017] wskazują na oporność na działanie penicyliny i ampicyliny aż 97,0% badanych szczepów. Podobne wyniki uzyskał Obaidat i wsp. [2015]. W badaniach Jamali i wsp. [2015] 59,4% szczepów *L. monocytogenes* było opornych

na działanie erytromycyny, natomiast w badaniach Kroplewskiej [2019] 71,9% szczepów wykazywało oporność na meropenem. Szerzące się zjawisko antybiotykooporności wśród szczepów *L. monocytogenes* i towarzyszący jemu wzrost zachorowalności na listeriozę w ostatnich latach stanowią realne zagrożenie zdrowia publicznego. Kontrola potencjalnej antybiotykooporności, w stosunku do antybiotyków rekomendowanych w leczeniu listeriozy, jest szczególnie istotna.

Jakość i bezpieczeństwo wytwarzanych produktów spożywczych pozostaje priorytetem dla producentów żywności. Mikrobiologiczne bezpieczeństwo produktów może być zapewnione jedynie wówczas, gdy zachowane zostają odpowiednie standardy dotyczące higieny wymienione w Wytycznych Dobrej Praktyki Higienicznej i Produkcyjnej. Należą do nich m.in. wytyczne dotyczące mycia i dezynfekcji. Po zakończeniu zmiany lub pracy w zakładzie przeprowadza się sprzątanie, które obejmuje powierzchnię podłóg, blatów oraz urządzeń. Zabiegów mycia i dezynfekcji należy dokonywać według ściśle określonych instrukcji, zgodnie z opracowanym harmonogramem i z użyciem środków myjących i dezynfekcyjnych dopuszczonych do kontaktu z żywnością. Środki dezynfekcyjne zatwierdzone do stosowania w przemyśle spożywczym to głównie alkohole, utleniacze, związki na bazie jodoforów, na bazie chloru, nadsiarczany, surfaktanty i czwartorzędowe związki amoniowe [Wirtanen i Salo, 2003]. Substancjami powszechnie stosowanymi w dezynfekcji owoców i warzyw są: podchloryn sodu, kwaśny chloryn sodu, dwutlenek chloru, nadtlenuk wodoru, kwas nadoctowy, woda elektrolizowana i ozon [São José i Vanetti, 2015].

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że najskuteczniejszymi środkami w ograniczaniu rozwoju *L. monocytogenes* był środki z rodzaju chlorowców oraz związków utleniających. W przypadku wszystkich badanych środków dezynfekcyjnych wyznaczone w wyniku badań MIC oraz MBC były kilkukrotnie niższe niż rekomendowane przez producenta stężenia robocze. Lundén i wsp. [2003] badali wpływ wybranych środków dezynfekcyjnych z rodzaju chlorowców i czwartorzędowych związków amoniowych na szczepy *L. monocytogenes* wyizolowane z zakładów produkujących lody. Møretro i wsp. [2016] badali natomiast wpływ wybranych dezynfektantów z rodzaju czwartorzędowych związków amoniowych na szczepy *L. monocytogenes* pochodzące z zakładów przetwórczych rybnych i mięsnych. W obu opisywanych przypadkach stwierdzono zróżnicowane poziomy skuteczności działania dezynfektantów, w zależności od szczepu bakterii. Analizując wyniki własne i innych autorów stwierdza się, że wyznaczone doświadczalnie MIC/MBC są niższe niż rekomendowane przez producenta, co wskazuje na skuteczność działania wybranych środków przy zastosowaniu odpowiednich stężeń roboczych.

7. WNIOSKI

1. W monitorowanych zakładach przetwórstwa owocowo-warzywnego występują bakterie *Listeria monocytogenes*. Najczęściej izolowano je z mrożonych produktów, następnie z wymazów z linii technologicznych, świeżych surowców i produktów, najrzadziej natomiast z wymazów z elementów i powierzchni niemających bezpośredniego kontaktu z przetwarzaną żywnością.
2. Genetyczne różnicowanie izolatów pozwoliło na przyporządkowanie ich do 41 szczepów, spośród których 13 było reprezentowanych przez więcej niż jeden izolat.
3. Analizy pokrewieństwa genetycznego izolatów wskazują, że potencjalną drogą transmisji pałeczek *L. monocytogenes* na teren zakładu są świeże surowce, skąd bakterie trafiają na powierzchnie i elementy linii technologicznych przyczyniając się skażeniu gotowych produktów. Obserwowano również sporadyczne przypadki transmisji bakterii bezpośrednio z surowca do gotowego produktu.
4. Ponad połowa szczepów *L. monocytogenes* należała do serotypu 1/2a-3a, pozostałe do 1/2b-3b i 4b-4d-4e. Do serotypu 4b-4d-4e (będącego najczęściej izolowanym serotypem epidemicznym) należały wyłącznie szczepy pochodzące z mrożonych produktów. Należy wnioskować, że wszystkie szczepy *L. monocytogenes* wyizolowane ze środowiska zakładów przetwórczych, surowców i produktów stanowią potencjalne zagrożenie dla zdrowia konsumentów.
5. Badane szczepy charakteryzowały się zróżnicowanym profilem wirulencji. Ponad 20% z nich posiadało wszystkie wybrane geny wirulencji. W związku z powyższym można wnioskować, że występowanie genów wirulencji może wskazywać na potencjalną patogenność dla ludzi.
6. Szczepy *L. monocytogenes* cechowały się różną wrażliwością na działanie biologicznych związków antybakteryjnych. Najbardziej odporne na działanie lizozymu, preparatu fagowego i nizyny były szczepy wyizolowane z mrożonek.
7. Ponad 46% badanych szczepów wykazywało silną zdolność do tworzenia biofilmu. Wszystkie wyizolowano z mrożonek. Antybakteryjne czynniki biologiczne (lizozym, nizyna, fagi) ograniczały powstawanie tej struktury i eliminowały już istniejącą błonę biologiczną. Wydaje się więc, że mogłyby one poprawić skuteczność dezynfekcji linii produkcyjnej i zapobiegać rozprzestrzenianiu się *L. monocytogenes* w środowisku zakładów i w produktach.

8. Ponad 30% szczepów charakteryzowało się opornością na wybrane antybiotyki stosowane w leczeniu listeriozy. Najwięcej szczepów było opornych na meropenem.
9. Zastosowane w zakładach zabiegi czyszczenia i dezynfekcji okazały się niewystarczające, aby skutecznie ograniczyć transmisję *L. monocytogenes*. Wyniki badań wskazują, że rozwój bakterii najskuteczniej ograniczały chlorowce oraz związki utleniające.
10. Zaleca się kontynuowanie monitoringu badanych obiektów obejmującego badanie cech fenotypowych i genotypowych *L. monocytogenes* oraz ocenę wpływu różnych czynników na te bakterie, co umożliwi wdrożenie skuteczniejszych metod kontroli ich występowania w żywności.

8. LITERATURA

- [1]Adzitey F., Huda N., 2010. *Listeria monocytogenes* in foods: incidences and possible control measures. *African Journal of Microbiology Researches*, 4, 2848–2855.
- [2]AFNOR, 2018a. *Listeria* spp. [online]. Association Française de Normalisation. Dostęp: nf-validation.afnor.org/en/food-industry/listeria-spp/.
- [3]AFNOR, 2018b. *Listeria monocytogenes* [online]. Association Française de Normalisation. Dostęp: nf-validation.afnor.org/en/food-industry/listeria-monocytogenes.
- [4]Allen K. J., Wałęcka-Zacharska E., Chen J. C., Kosek-Paszowska K., Devlieghere F., Van Meervenue E., Osek J., Wiczorek K., Bania J., 2016. *Listeria monocytogenes* – an examination of food chain factors potentially contributing to antimicrobial resistance. *Food Microbiology*, 54, 178 – 189.
- [5]Amalaradjou M. A. R., Norris C. E., Venkitanarayanan K., 2009. Effect of Octenidine Hydrochloride on Planktonic Cells and Biofilms of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(12), 4089–4092.
- [6]ANSES. <https://pro.anses.fr/eurl-listeria/index.htm>
- [7]AOAC, 2018. Performance tested methods: validated methods [online]. AOAC INTERNATIONAL Research Institute. Dostęp: www.aoc.org/AOAC_Prod_Iimis/AOAC/RI/PTMM/AOAC_Member/
- [8]Arciola C. R., Campoccia D., Gamberini S., Cervellati M., Donati M., Montanaro L., 2022. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. *Biomaterials*, 23(21), 4233-4239. DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00171-0.
- [9]Ayebah B., Hung Y. C., Frank J. F., 2005. Enhancing the bactericidal effect of electrolyzed water on *Listeria monocytogenes* biofilms formed on stainless steel. *Journal of Food Protection*, 68, 1375–1380.
- [10]Aznar R., Alarcón B., 2003. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 958–966.
- [11]Baker J., Sitthisak S., Sengupta M., Johnson M., Jayaswal R. K., Morrissey J. A., 2010. Copper Stress Induces a Global Stress Response in *Staphylococcus aureus* and *Represses sae* and *agr* Expression and Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1), 150–160. DOI: 10.1128/AEM.02268-09.
- [12]Bermúdez-Aguirre D., Barbosa-Cánovas G. V., 2013. Disinfection of selected vegetables under nonthermal treatments: Chlorine, acid citric, ultraviolet light and ozone. *Food Control*, 29, 82-90.
- [13]Berthold A., 2007. Biofilmy w przemyśle spożywczym. *Postępy Techniki Przewództwa Spożywczego*, 1/2007, 60-66.
- [14]Bertsch C., Mueller M., Weller M., Uruty A., Lacroix C., Meile L., 2014. Antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance gene transfer analysis of foodborne, clinical, and environmental *Listeria* spp. isolates including *Listeria monocytogenes*. *MicrobiologyOpen*, 3(1), 118-127. DOI: 10.1002/mbo3.155.
- [15]Błaszczyk J. A., Wang B., Silakov A., Ho J. V., Booker S. J., 2017. Efficient methylation of C2 in l-tryptophan by the cobalamin-dependent radical S-

- adenosylmethionine methylase TsrM requires an unmodified N1 amine. *Journal of Biological Chemistry*, 292(37), 15456-15467. DOI: 10.1074/jbc.M117.778548.
- [16] Bonsaglia E. C. R., Silva N. C. C., Fernandes Júnior A., Araújo Júnior J. P., Tsunemi M. H., 2014. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control*, 35, 386-391.
- [17] Bortolussi R., 2008. Listeriosis: a primer. *Canadian Medical Association Journal*, 179(8), 795-797, DOI: 10.1503/cmaj.081377.
- [18] Bremer P. J., Monk I., Osborne C. M., 2001. Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium* spp. *Journal of Food Protection*, 64(9), 1369-1376.
- [19] Bren L., 2007. Bacteria-eating virus approved as food additive. *FDA consumer*, 41(1), 20-22.
- [20] Budzińska K., Wroński G., Szejnku B., 2012. Survival Time of Bacteria *Listeria monocytogenes* in Water Environment and Sewage. *Polish Journal of Environmental Studies*, 21, 31-37.
- [21] 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, 623 – 636.
- [22] Carlton R. M., Noordman W. H., Biswas B., de Meester E. D., Loessner M. J., 2005. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 43, 301-312.
- [23] Carpentier B., Chassaing D., 2004. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *International Journal of Food Microbiology*, 97, 111- 22.
- [24] Caveria V. L., Arthur T. D., Kashtanov D., Chikindas M. L., 2015. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46, 494-501.
- [25] Chen M., Cheng J., Wu Q., Zhang J., Chen Y., Xue L., Lei T., Zeng H., Wu S., Ye Q., Bai J., Wang J., 2018. Occurrence, antibiotic resistance, and population diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh aquatic products in China. *Frontiers in Microbiology*, 9: 2215. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02215.
- [26] Chmiel M. J., Frączek K., 2016. Mikroorganizmy wskaźnikowe w ocenie stanu sanitarnego gleby. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 587, 51-62.
- [27] Chmielewski R. A. N., Frank J. F., 2006. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 22-32. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x.
- [28] Churchill R. L., Lee H., Hall J. C., 2006. Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. *Journal of Microbiological Methods*, 64, 141 – 170.
- [29] Clayton E. M., Hill C., Cotter P. D., Ross R.P., 2011. Real-time PCR assay to differentiate listeriolysin S-positive and -negative strains of *Listeria monocytogenes*. *Application Environmental Microbiology*, 77, 163-171.
- [30] Cleveland J., Montville T. J., Nes I. F., Chikindas M. L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71(1), 1-20. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00560-8.

- [31] Colagiorgi A., Bruini I., Di Ciccio P. A., Zanardi E., Ghidini S., Ianieri A., 2017. *Listeria monocytogenes* biofilms in the wonderland of food industry. *Pathogens*, 6: 41. DOI: 10.3390/pathogens6030041.
- [32] Collins A. V., Brodie D. W., Gilbert R. J. C., Iaboni A., Manso-Sancho R., Walse B., Stuart D. I., van der Merwe D. A., Davis S. I., 2002. The Interaction Properties of Costimulatory Molecules Revisited. *Immunity*, 17(2), 201-210.
- [33] Cotter P. D., Draper L. A., Lawton E. M., Daly K. M., Groeger D. S., Casey P. G., Ross R. P., Hill C., 2008. Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathogens*, 4. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000144.
- [34] Cremonesi P., Cortimiglia C., Picozzi C., Minozzi G., Malvisi M., Luini M., Castiglioni B., 2016. Development of a droplet digital polymerase chain reaction for simultaneous identification of common foodborne pathogens in soft cheese. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1725. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01725.
- [35] Czaczyk K., Wojciechowska K., 2003. Tworzenie biofilmów bakteryjnych – istota zjawiska i mechanizmy oddziaływań. *Biotechnologia*, 3(62), 180-192.
- [36] D'Ostuni V., Tristezza M., De Giorgi M. G., Rampino P., Grieco F., Perrotta C., 2016. Occurrence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in meat processed products from industrial plants in Southern Italy. *Food Control*, 62, 104 – 109.
- [37] Daniluk K. J., Wójcicki M., Juszczuk-Kubiak E., 2021. Biofilm bakteryjny i możliwości jego eliminacji w przemyśle spożywczym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 28, 2 (127), 5 – 20. DOI: 10.15193/zntj/2021/127/374.
- [38] Das S., Lalitha K. V., Thampuran N., Surendran P. K., 2013. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* from tropical seafood of Kerala, India. *Annals of Microbiology*, 63, 1093 – 1098.
- [39] Davis R., Mauer L. J., 2011. Subtyping of *Listeria monocytogenes* at the haplotype level by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and multivariate statistical analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 130(2-3), 140-149. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.024.
- [40] De Arauz L. J., Jozala A. F., Mazzola P. G., Penna T. C. V., 2009. Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(3–4), 146-154. DOI: 10.1016/j.tifs.2009.01.056.
- [41] De Mello J. F., Einsfeldt K., Frazzon A. P. G., Da Costa M., Frazzo J., 2008. Molecular analysis of the iap gene of *Listeria monocytogenes* isolated from cheeses in Rio Grande do Sul. *Brazil Journal Microbiology*, 39, 169-172.
- [42] Den Bakker H. C., Bowen B. M., Rodriguez-Rivera L. D., Wiedmann M., 2012. FSL J1-208, a virulent uncommon phylogenetic lineage IV *Listeria monocytogenes* strain with a small chromosome size and a putative virulence plasmid carrying internalin-like genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 1876 – 1889.
- [43] Den Bekker H. C., Cummings C. A., Ferreira V., Vatta P., Orsi R. H., Degoricija L., Barker M., Petrauskene O., Furtado M. R., Wiedmann M., 2010. Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterised by limited gene acquisition and limited gene loss. *BMC Genomics*, 11, 1471-2164.

- [44]Denes T., Wiedmann M., 2014. Environmental responses and phage susceptibility in foodborne pathogens: implications for improving applications in food safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 45-49.
- [45]Dice L. R., 1945. Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species. *Ecology*, 26(3), 297-302.
- [46]Dmowska K., Osek J., 2010. Molekularne aspekty chorobotwórczości *Listeria monocytogenes*. *Medycyna Weterynaryjna*, 66, 236 – 241.
- [47]Doménech E., Jimenez -Belenguer A., Amoros J. A., Ferrus M. A., Escriche I., 2015. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and Salmonella strains isolated in ready-to-eat foods in Eastern Spain. *Food Control*, 47, 120-125.
- [48]Doumith M., Buchrieser C., Glaser P., Jacquet C., Martin P., 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 3819 – 3822.
- [49]Esteban J. I., Oporto B., Aduriz G., Juste R. A., Hurtado A., 2009. Faecal shedding and strain diversity of *Listeria monocytogenes* in healthy ruminants and swine in Northern Spain. *BMC Veterinary Research*, 5, 1746–6148.
- [50]EUCAST, 2018. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameter [online]. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.
- [51]EUCAST, 2021. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameter [online]. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
- [52]European Food Safety Authority EFSA. Annual Report 2009.
- [53]European Food Safety Authority EFSA. Annual Report 2013.
- [54]Exner M., Bhattacharya S., Christiansen B., Gebel J., Goroncy-Bermes P., Hartemann P., Heeg P., Ilchner C., Kramer A., Larson E., Merckens W., Mielke M., Oltmanns P., Ross B., Rotter M., Schmithausen R. M., Sonntag H.-G., Trautmann M., 2017. Antibiotic resistance: what is so special about multidrugresistant Gram-negative bacteria? *GMS Hygiene and Infection*, 12: Doc05. DOI: 10.3205/dgkh000290.
- [55]Fakruddin K., Kumar R. J., Pisipati V. G. K. M., Latha D. M., Madhav B. T. P., Prasad P. V. D., 2010. Phase Transitions and Thermodynamic Parameters of N-(p-n-octyloxybenzylidene)-p-n-alkoxyanilines—A Dilatometric Study. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 524, 102-118.
- [56]Fallah A. A., Saei-Dehkordi S. S., Mahzounieh M., 2013. Occurrence and antibiotic resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from seafood products and market and processing environments in Iran. *Food Control*, 34, 630 – 636.
- [57]Félix B., Sevellec Y., Palma F., Douarre P. E., Felten A., Radomski N., Mallet L., Blanchard Y., Leroux A., Soumet C., Bridier A., Piveteau P., Ascensio E., Hébraud M., Karpíšková R., Gelbíčová T., Torresi M., Pomilio F., Cammà C., Di Pasquale A., Skjerdal T., Pietzka A., Ruppitsch W., Canelhas M. R., Roussel S., 2022. A European-wide dataset to uncover adaptive traits of *Listeria monocytogenes* to diverse ecological niches. *Scientific data*, 9(1), 190.
- [58]Franklin N. B., Cooksey K. D., Getty K. J., 2004. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on the Surface of Individually Packaged Hot Dogs with a Packaging Film Coating Containing Nisin. *Journal of Food Protection*, 67(3), 2004, 480–485.

- [59]Freeman D. J., Falkiner F. R., Keane C. T., 1989. New method detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal Clinical Pathology*, 42, 872-874.
- [60]Gajda E., Bugła-Płoskońska, 2014. Lizozym – występowanie w przyrodzie, właściwości biologiczne i możliwości zastosowań. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 68, 1501-1515. DOI: 10.5604/17322693.1133100.
- [61]Galińska E., Knap J. P., Stroczyńska-Sikorska M., 2010. Listerioza – mało znana, niebezpieczna choroba zakaźna. *Medycyna Ogólna*, 16, 516 – 527.
- [62]Gasanov U., Hughes D., Hansbro P. M., 2005. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 29, 851 – 875.
- [63]Gelbířová T., Karpíšková R., 2012. Outdoor environment as a source of *Listeria monocytogenes* in food chain. *Czech Journal of Food Sciences*, 30, 83 – 88.
- [64]GIS, 14.06.2018. Ostrzeżenie! Stwierdzono obecność bakterii *Listeria monocytogenes* w parówkach z szynki [online]. Główny Inspektorat Sanitarny. Dostęp: www.gis.gov.pl/zywnosc-i-woda/ostrzezenie-dot-stwierdzeniaobecnosci-bakterii-listeria-monocytogenes-w-parowkach-z-szynki-simply-food.
- [65]GIS, 2013. Ostrzeżenie publiczne dotyczące żywności. Obecność bakterii *Listeria monocytogenes* w ilości przekraczającej dopuszczalny limit w produkcie pn. Castello Rum 125 g [online]. Główny Inspektorat Sanitarny. Dostęp: www.gis.gov.pl/kategoria/zywnosc-i-woda/normy-i-prawo/ostrzezeniapubliczne-dot-zywnosci.
- [66]GIS, 2014. Ostrzeżenie publiczne dotyczące żywności. Obecność bakterii *Listeria monocytogenes* w produkcie pn. Masło Ekstra Górskie [online]. Główny Inspektorat Sanitarny. Dostęp: www.gis.gov.pl/kategoria/zywnosc-i-woda/normy-i-prawo/ostrzezeniapubliczne-dot-zywnosci.
- [67]GIS, 23.07.2018. Ostrzeżenie publiczne dotyczące żywności. Stwierdzenie bakterii *Listeria monocytogenes* w twarogu sernikowym [online]. Główny Inspektorat Sanitarny. Dostęp: www.gis.gov.pl/zywnosc-i-woda/ostrzezeniepubliczne-dotyczace-zywnosci-stwierdzenie-bakterii-listeria-monocytogenes-wtwarogu-sernikowym.
- [68]GIS, 3.07.2018. Ostrzeżenie publiczne dotyczące żywności. Stwierdzenie bakterii *Listeria monocytogenes* w kielbasie śląskiej z szynki ekstra! [online]. Główny Inspektorat Sanitarny. Dostęp: www.gis.gov.pl/zywnosc-i-woda/bakteria-listeriamonocytogenes-w-kielbasie-slaskiej-z-szynki-ekstra.
- [69]GIS, 31.07.2018. Aktualizacja komunikatu Głównego Inspektora Sanitarnego w sprawie mrożonych warzyw [online]. Główny Inspektorat Sanitarny. Dostęp: www.gis.gov.pl/zywnosc-i-woda/wycofanie-mrozonych-warzyw-przez-firmegreenyard.
- [70]GIS, 9.07.2018. Komunikat Głównego Inspektora Sanitarnego w sprawie mrożonych warzyw [online]. Główny Inspektorat Sanitarny. Dostęp: www.gis.gov.pl/zywnosc-i-woda/komunikat-glownego-inspektora-sanitarnego-w-sprawie-mrozonych-warzyw.
- [71]Gliński Z., Kostro K., 2012. Listerioza współczesnym zagrożeniem. *Życie Weterynaryjne*, 87, 577 – 581.

- [72]Gómez-López V. M., Ragaert P., Debevere J., Devlieghere F., 2007. Pulsed light for food decontamination: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 18(9), 464-473. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.03.010.
- [73]Górski L., 2008. Phenotypic identification *In. Handbook of Listeria monocytogenes*. CRC Press, Boca Raton, 139–168.
- [74]Graves L., Helsel L. O., Steigerwalt A. G., Morey R. E., Daneshvar M. I., Roof S. I., Orsi R. H., Fortes E. D., Milillo S. R., den Bakker H. C., Wiedmann M., Swaminathan B., Sauters B. D., 2010. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 1280–1288. DOI: 10.1099/ijs.0.014118-0.
- [75]Gray M. J., Freitah N. E., Boor K. J., 2006. How the Bacterial Pathogen *Listeria monocytogenes* Mediates the Switch from Environmental Dr. Jekyll to Pathogenic Mr. Hyde. *Infection and Immunity*, 74(5), 2505-2512. DOI: 10.1128/iai.74.5.2505-2512.2006.
- [76]Greenyard Frozen Poland, 13.07.2018. Ważne – informacja o wycofaniu produktów [online]. Daucy Polska Sp. z o. o. Dostęp: www.daucyinspiruje.pl/Informacja_dla_klient%C3%B3w_daucy_13.07.2018.pdf.
- [77]Greer, G.G. Bacteriophage control of foodborne bacteria. *Journal of Food Protection*, 2005, 68, 1102–1111.
- [78]Gridneva Z., Lai C. T., Rea A., Wan J. Tie, Ward L. C., Murray K., Hartmann P. E., Geddes D. T., 2021. Human milk immunomodulatory proteins are related to development of infant body composition during the first year of lactation. *Pediatric Research*, 89, 911–921.
- [79]Grisi T. C. S. L., Gorlach-Lira K., 2008. Action of nisin and high pH on growth of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. in pure culture and in the meat of land crab (*Ucides cordatus*). *Food Microbiology, Brazilian Journal of Microbiology*, 36(2). DOI: 10.1590/S1517-83822005000200010.
- [80]Gumulya Y., Boxall N. J., Khaleque H. N., Santal V., Carlson R. P., Kaksonen A. H., 2018. In a quest for engineering acidophiles for biomining applications: challenges and opportunities. *Genes*, 9(2). DOI: 10.3390/genes9020116.
- [81]Hagens S., Offerhaus M. L., 2008. Bacteriophages – New Weapons for Food Safety. *A Publication of the Institute of Food Technologists*, 62(4).
- [82]Hernandez-Milian A., Payeras-Cifre A., 2014. What Is New in Listeriosis? *Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International*. DOI: 10.1155/2014/358051.
- [83]Hitchins A. D., Jinneman K., Chen Y., 2017. Chapter 10. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods [online]. *Bacteriological Analytical Manual*. Dostęp: www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm.
- [84]Hughes V. L., Wilger P. A., Johnson E. A., 1989. Antibacterial Activity of Hen Egg White Lysozyme against *Listeria monocytogenes* Scott A in Foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(3), 631-638.
- [85]Hygiena, 2017. Lateral Flow System. Immunoassay alternative for routine pathogen screening [online]. Hygiena. Dostęp: www.hygienea.com/lfs.html.

- [86]Inslab, 2017. MicroSnapTM. Testy specyficzne [online]. Inslab. Dostęp: www.inslab.com.pl/testy-na-obecnosc-mikroorganizmow.
- [87]Iturralde-García R. D., Cinco-Moroyoqui F. J., Martínez-Cruz O., Ruiz-Cruz S., Wong-Corral F. J., Borboa-Flores J., Cornejo-Ramírez Y. J., Bernal-Mercado A. T., Del-Toro-Sánchez C. L., 2022. Emerging Technologies for Prolonging Fresh-Cut Fruits' Quality and Safety during Storage. *Horticulturae* 8, 731. DOI: 10.3390/horticulturae8080731.
- [88]Jadhav S., Gulati V., Fox E. M., Karpe A., Beale D. J., Seviour D., Bhawe M., Palombo E. A., 2015. Rapid identification and source-tracking of *Listeria monocytogenes* using MALDI-TOF mass spectrometry. *International Journal of Food Microbiology*, 202, 1 – 9.
- [89]Jamal M., Tasneem U., Hussain T., Andleeb S., 2015. Bacterial biofilm: its composition, formation and role in human infections. *Research and Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*, 4, 1 – 14.
- [90]Jamali H., Chai L. C., Thong K. L., 2013. Detection and isolation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods with various selective culture media. *Food Control*, 32, 19 – 24.
- [91]Jaroszevska E., Pietracha D., Misiewicz A., 2014. Human pathogens in plant food - applications of real-time PCR methods for their detection. *Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego*, 69, 44-54.
- [92]Jemmi T., Stephan R., 2006. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. *Revue scientifique et technique International Office of Epizootics*, 25(2), 571-580.
- [93]Jeyalethumi P., Tunung R., Margaret S. P., Son R., Farinazleen M. G., Cheah Y. K., 2010. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *Interbational Food Researches Journal*, 17, 1-11.
- [94]Jinneman K. C., Hill W. E., 2001. *Listeria monocytogenes* lineage group classification by MAMA-PCR of listeriolysin gene. *Current microbiology*, 43, 129-133.
- [95]Jordan K., Hunt K., Lourenco A., Pennone V., 2018. *Listeria monocytogenes* in the food processing environment. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5, 106 – 119.
- [96]Jung B., Lim H., Jung S., 2003. Development od Differential Media and Multiplex PCR Assays for the Rapid Detection of *Listeria monocytogenes*. *Korean Journal of Veterinary Researches*, 43, 231-237.
- [97]Kastbjerg V. G., Gram L., 2012. Industrial disinfectants do not select for resistance in *Listeria monocytogenes* following long term exposure. *International Journal of Food Microbiology*, 160, 11–15.
- [98]Khen B. K., Lynch O. A., Carroll J., McDowell D. A., Duffy G., 2015. Occurrence, antibiotic resistance and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* in the beef chain in the Republic of Ireland. *Zoonoses Public Health*, 62, 11–17.
- [99]Kijowski J., Sikora T., 2003. Zarządzania jakością i bezpieczeństwem żywności., Wydawnictwo Naukowo Techniczne, Warszawa.
- [100]Kołakowska A., Madajczak G., 2011. *Listeria monocytogenes* w zakażeniach ludzi. *Przegląd Epidemiologiczny*, 65, 57 – 62.
- [101]Koreňová J., Oravcová K., Véghová A., Karpíšková R., Kuchta T., 2016. Biofilm formation in various conditions is not a key factor of persistence

- potential of *Listeria monocytogenes* in food-processing environment. *Journal of Food and Nutrition Research*, 55, 189 – 193.
- [102]Kostakioti M., Hadjifrangiskou M., Hultgren S. J., 2013. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3: a010306. DOI: 10.1101/cshperspect.a010306.
- [103]Kowalik J., Adamczewski K., Ziajka S., 2014. Szacowanie wzrostu liczby komórek *Listeria monocytogenes* w serze mozzarella z wykorzystaniem urządzenia impedymetrycznego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, 1(92), 66 – 77. DOI: 10.15193/zntj/2014/92/066-077.
- [104]Kowalska H., 2010. Odwrocona osmoza - bezpieczne filtrowanie. Cz.I *Bezpieczeństwo i Higiena Żywności*, 07-08, 55-57.
- [105]Kramarenko T., Roasto M., Meremäe K., Kuningas M., Pölsama P., Elias T., 2013. *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. *Food Control*, 30, 24–29.
- [106]Kroplewska M., 2019. Charakterystyka szczepów *Listeria monocytogenes* izolowanych ze środowiska wybranych zakładów przetwórstwa spożywczego przy użyciu klasycznych metod mikrobiologicznych oraz metod biologii molekularnej. Rozprawa Doktorska. Bydgoszcz 2019.
- [107]Kuan C. H., Goh S. G., Loo Y. Y., Chang W. S., Lye Y. L., Puspanadan S., Tang J. Y. H., Nakaguchi Y., Nishibuchi M., Mahyudin N. A., Radu S., 2013a. Prevalence and quantification of *Listeria monocytogenes* in chicken offal at the retail level in Malaysia. *Poultry Science*, 92, 1664 – 1669.
- [108]Kwiecińska-Piróg J., Bogiel T., Skowron K., Więckowska E., Gospodarek E., 2014. Proteus mirabilis biofilm – qualitative and quantitative colorimetric methods-based evaluation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 1415 – 1421.
- [109]Kwong J. C., McCallum N., Sintchenko V., Howden B. P., 2015. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology*, 47, 199 – 210.
- [110]Kwong J. C., McCallum N., Sintchenko V., Howden B. P., 2015. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology*, 47, 199 – 210.
- [111]Leclercq A., Clermont C., Bizet C., Grimont P. A. D., Le Fle`che-Mate`os A., Roche S. A., Buchrieser C., Cadet-Daniel V., Le Monnier A., Lecuit M., Allerberger F., 2010. *Listeria rocourtiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60, 2210–2214. DOI: 10.1099/ijs.0.017376-0.
- [112]Lee D. Y., Ha J. H., Lee M. K., Cho Y. S., 2017. Antimicrobial susceptibility and serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat seafood 137 and food processing environments in Korea. *Food Science and Biotechnology*, 26, 287 – 291.
- [113]Lei I. F., Roffey P., Blanchard C., Gu K., 2008. Development of a multiplex PCR method for the detection of six common foodborne pathogens. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16(4), 37-43.
- [114]Leong D., Alvarez-Ordóñez A., Jordan K., 2014. Monitoring occurrence and persistence of *Listeria monocytogenes* in foods and food processing environments in the Republic of Ireland. *Frontiers in Microbiology*, 5: 436. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00436.
- [115]Leong D., NicAogáin K., Luque-Sastre L., McManamon O., Hunt K., AlvarezOrdóñez A., Scollard J., Schmalenberger A., Fanning S., O'Byrne C.,

- Jordan K., 2017. A 3-year multi-food study of the presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in 54 small food businesses in Ireland. *International Journal of Food Microbiology*, 249, 18 – 26.
- [116]Letchumanan V., Wong P., Goh B., Ming L. C., Pusparajah P., Wong S. H., Mutalib N. A., Lee L., 2018. A review on the characteristics, taxonomy and prevalence of *Listeria monocytogenes*. *Progress In Microbes & Molecular Biology*, 1/2018, 1 – 8.
- [117]Leverentz B., Conway W. S., Camp M. J., Janisiewicz W. J., Abuladze T., Yang M., Saftner R., Sulakvelidze A., 2003. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on Fresh-Cut Produce by Treatment with Lytic Bacteriophages and a Bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(8): 4519–4526. DOI: 10.1128/AEM.69.8.4519-4526.2003.
- [118]Linke K., Ruckerl I., Brugger K., Karpíšková R., Walland J., Muri-Klinger S., Tichy A., Wagner M., Stessl B., 2014. Reservoirs of *Listeria* species in three environmental ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 5583 – 5592.
- [119]Liu D., 2006. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 645 – 659.
- [120]Lundén J. M., Miettinen M. K., Autio T. J., Korkeala H. J., 2000. Persistent *Listeria monocytogenes* Strains Show Enhanced Adherence to Food Contact Surface after Short Contact Times. *Journal of Food Protection*, 63(9), 1204–1207.
- [121]Madajczak G., Majczyna D., 2009. Serologiczne typowanie i genoserotypowanie pałeczek *Listeria monocytogenes* izolowanych z próbek materiału klinicznego, próbek żywności i próbek środowiskowych. *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia*, 61, 79 – 85.
- [122]Madajczak G., Szych J., 2010. Ocena przydatności testu Premi®Test Salmonella do identyfikacji pałeczek *Salmonella* nietypujących się metodami klasycznymi. *Medycyna Doświadczalna Mikrobiologiczna*, 62, 29-36.
- [123]Magiorakos A.-P., Srinivasan A., Carey R. B., Carmeli Y., Falagas M. E., Giske C. G., Harbarth S., Hindler J. F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D. L., Rice L. B., Stelling J., Struelens M. J., Vatopoulos A., Weber J. T., Monnet D. L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 268 – 281.
- [124]Maury M. M., Chenal-Francois V., Bracq-Dieye H., Han L., Leclercq A., Vales G., Moura A., Gouin E., Scortti M., Disson O., Vázquez-Boland J. A., Lecuit M., 2017. Spontaneous loss of virulence in natural populations of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 85: e00541-17. DOI: 10.1128/IAI.00541-17.
- [125]Mazaheri T., Cervantes-Huamán B. R. H., Bermúdez-Capdevila M., Ripolles-Avila C., Rodríguez-Jerez J. J., 2021. *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Food Industry: Is the Current Hygiene Program Sufficient to Combat the Persistence of the Pathogen? *Microorganisms*, 9(1), 181. DOI: 10.3390/microorganisms9010181

- [126]Melo J., Andrew P. W., Faleiro M. L., 2015. *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. *Food Research International*, 67, 75-90.
- [127]Merck, 2017. Technical info: Singlepath® L'mono for the rapid detection and confirmation of *Listeria monocytogenes* in foods [online]. Merck. Dostęp: http://www.merckmillipore.com/PL/pl/product/SinglepathLmono,MDA_CHEM-104148#anchor_TI.
- [128]Miceli A., Settanni L., 2019. Influence of agronomic practices and pre-harvest conditions on the attachment and development of *Listeria monocytogenes* in vegetables. *Annals of Microbiology*, 69, 185–199.
- [129]Miladi H., Chaieb K., Bakhrouf A., Emlnasser N., Ammar E., 2008. Freezing effects on survival of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cold fresh-salmon. *Annals of Microbiology*, 58(3) 471-476.
- [130]Milohanic E., Glaser P., Coppée J.-Y., Frangeul L., Vega Y., Vázquez- Boland J. A., Kunst F., Cossart P., Buchrieser C., 2003. Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Molecular Microbiology*, 47, 1613 – 1625.
- [131]MOH, 2018. *Listeria*. Virulence factors of pathogenic bacteria [online]. MOH Key Laboratory of Systems Biology of Pathogens. Dostęp: www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/genus.cgi?Genus=Listeria.
- [132]Molenda J., 2009. Listeriosis – pathogenicity, a food safety perspective. *Medycyna Weteryjaryjna*, 65, 3, 151-154.
- [133]Molenda J., 2009. Listerioza – patogeneza, perspektywy bezpieczeństwa żywności. *Medycyna Weteryjaryjna*, 65, 151–154.
- [134]Molinos A. C., Abriouel H., Omar N. B., Valdivia E., López R. L., Maqueda M., Martínez Cañamero M., Gálvez A., 2005. Effect of Immersion Solutions Containing Enterocin AS-48 on *Listeria monocytogenes* in Vegetable Foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 7781-7787. DOI: 10.1128/AEM.71.12.7781-7787.2005.
- [135]Moltz A. G., Martin S. E., 2005. Formation of Biofilms by *Listeria monocytogenes* under Various Growth Conditions. *Journal of Food Protection*, 68(1), 92-97.
- [136]Montero D., Boderó M., Riveros G., Lapierre L., Gaggero A., Vidal R. M., Vidal M., 2015. Molecular epidemiology and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from a wide variety of ready-to-eat foods and their relationship to clinical strains from listeriosis outbreaks in Chile. *Frontiers in Microbiology*, 6: 384. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00384.
- [137]Møretro T., Schirmer B. T. C., Heir E., Fegerlund A., Hjemli P., Langsrud S., 2017. Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may enhance growth of *Listeria monocytogenes* i the food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 215-224.
- [138]Muhterem-Uyar M., Dalmasso M., Bolocan A. S., Hernandez M., Kapetanakou A. E., Kuchta T., Manios S. G., Melero B., Minarovicova J., Nicolau A. I., Rovira J., Skandamis P. N., Jordan K., Rodríguez-Lazaro D., Stessl B., Wagner M., 2014. Environmental sampling for *Listeria monocytogenes* control in food processing facilities reveals three contamination scenarios. *Food Control*, 51, 94-107.

- [139]Muhterem-Uyar M., Dalmasso M., Bolocan A. S., Hernandez M., Kapetanakou A. E., Kuchta T., Manios S. G., Melero B., Minarovičová J., Nicolau A. I., Rovira J., Skandamis P. N., Jordan K., Rodríguez-Lázaro D., Stessl B., Wagner M., 2015. Environmental sampling for *Listeria monocytogenes* control in food processing facilities reveals three contamination scenarios. *Food Control*, 51, 94 – 107.
- [140]Muskalska K. B., Szymczak B., 2015. Postępy badań nad bakteriami rodzaju *Listeria*. *Postępy Mikrobiologii*, 54, 123 – 132.
- [141]Nattress F. M., Baker L. P., 2003. Effects of treatment with lysozyme and nisin on the microflora and sensory properties of commercial pork. *International Journal of Food Microbiology*, 85(3) 25, 259-267. DOI: 10.1016/S0168-1605(02)00545-7.
- [142]Nemati M., Hamidi A., Dizaj S. M. Javaherzadeh V., Lotfipour F., 2016. An overview on novel microbial determination methods in pharmaceutical and food quality control. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 6, 301 – 308.
- [143]Neogen, 2017. Reveal® 2.0 [online]. Neogen. Dostęp: foodsafety.neogen.com/en/reveal-2#pathogens.
- [144]NIZP – PZH, 2018. Meldunki epidemiologiczne – EPIMELD [online]. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny. Dostęp: wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/index_p.html.
- [145]Nowicka P., Wojdyło A., Oszmiański J., 2014. Zagrożenia powstające w żywności minimalnie przetworzonej i skuteczne metody ich eliminacji. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, 2(9), 5-18. DOI: 10.15193/zntj/2014/93/005-018.
- [146]Olewnik-Mikołajewska A., 2.07.2018. Oświadczenie [online]. Zakłady Mięsne „OLEWNIK-BIS” Sp. z o. o. Dostęp: www.olewnik.com.pl.
- [147]Ołdak A., Zielińska D., 2017. Bakteriocynty bakterii fermentacji mlekowej jako alternatywa antybiotyków. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 71, 328-338. DOI: 10.5604/01.3001.0010.3817.
- [148]Palumbo J. D., Borucki M. K., Mandrell R. E., Gorski L., 2003. Serotyping of *Listeria monocytogenes* by enzyme-linked immunosorbent assay and identification of mixed-serotype cultures by colony immunoblotting. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 564 – 571.
- [149]Pavliček A., Hrdá Š., Flegr J., 1999. FreeTree – Freeware Program for Construcion of Phylogenetic Trees on the Basis of Distance Data and Bootstrap/Jackknife Analysis of the Tree Robustness. Application in the RAPD Analysis of Genus Frankelia. *Folia Biologica*, 45, 97-99.
- [150]Pietracha D., Misiewicz A., 2016. Use of Products Containing a Phage in Food Industry as a New Method for *Listeria monocytogenes* Elimination from Food (*Listeria monocytogenes* Phages in Food Industry) – a Review. *Czech Journal of Food Sciences*, 34, 1–8. DOI: 10.17221/217/2015-CJFS.
- [151]Piffaretti J., Kressebuch H., Aeschbacher M., Bille J., Bennerman E., Musser J. M., Selander R. K., Jocelyne R., 1989. Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 3818-3822.
- [152]Pinto A. D., Novello L., Montemurro F., Bonerba E., Tantillo G., 2010. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods from supermarkets in Southern Italy. *New Microbiology*, 33, 249–252.

- [153]Pinton S., Bardsley C. A., Marik C. M., Boyer R. R., Strawn L. K., 2020. Fate of *Listeria monocytogenes* on Broccoli and Cauliflower at Different Storage Temperatures. *Journal of Food Protection*, 83(5), 858-864. DOI: 10.4315/JFP-19-490.
- [154]Ploux L., Backendorff S., Nardin M., Neunlist S., 2007. Quantitative and morphological analysis of biofilm formation on self-assembled monolayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 57(2), 15, 174-181.
- [155]PN-EN ISO 11290-1:1999/A1:2005. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes*. Metoda wykrywania obecności [online]. Polski Komitet Normalizacyjny. Dostęp: sklep.pkn.pl/pn-en-iso-11290-1-1999-a1-2005p.html.
- [156]PN-EN ISO 11290-1:2017-07. Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes* i innych *Listeria* spp. Część 1. Metoda wykrywania [online]. Polski Komitet Normalizacyjny. Dostęp: sklep.pkn.pl/pn-en-iso-11290-1-2017-07e.html.
- [157]Poimenidou S. V., Dalmasso M., Papadimitriou K., Fox E. M., Skandamis P. N., Jordan K., 2018. Virulence gene sequencing highlights similarities and differences in sequences in *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains of clinical and food origin from 3 different geographic locations. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1103. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01103.
- [158]Rahman M. T., Uddin M. S., Sultana R., Moue A., Setu M., 2013. Polymerase Chain Reaction (PCR): a short review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, 4, 30 – 36
- [159]Ranasinghe R. A. S. S., Satharasinghe D. A., Tang J. Y. H., Rukayadi Y., Radu K. R., New C. Y., Son R., Premarathne J. M. K. J. K., 2021. Persistence of *Listeria monocytogenes* in food commodities: Foodborne pathogenesis, virulence factors, and implications for public health. *Food Research*, 5, 1– 16. DOI: 10.26656/fr.2017.5(1).199.
- [160]Rocourt J., Buchreiser C., 2007. Chapter 1. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*. Phylogenetic position, taxonomy, and identification. W: Ryser E. T., Marth E. H. (red.), 2007. *Listeria, listeriosis, and food safety* [online], wyd. 3, 1 – 20. CRC Press, USA.
- [161]Rodríguez-López P., Rodríguez-Herrera J. J., Vázquez-Sánchez D., López Cabo M., 2018. Current knowledge on *Listeria monocytogenes* biofilms in foodrelated environments: incidence, resistance to biocides, ecology and biocontrol. *Foods*, 7: 85. DOI: 10.3390/foods7060085.
- [162]Romanek J., 2011. Real-time PCR - nowoczesna technika analizy ekspresji genów na poziomie transkryptu. *Wiadomości Zootechniczne*, 49(1), 125-129.
- [163]Romer Labs, 2017. Fast & reliable *Listeria* test kits [online]. Romer Labs. Dostęp: www.romerlabs.com/en/analytes/food-pathogens/listeria/.
- [164]Russo P., Hadjilouka A., Beneduce L., Capozzi V., Paramithiotis S., Drosinos E. H., Spano G., 2018. Effect of different conditions on *Listeria monocytogenes* biofilm formation and removal. *Czech Journal of Food Sciences*, 36, 208 – 214.
- [165]SAID, 2018. Surveillance Atlas of Infectious Diseases [online]. European Centre for Disease Prevention and Control. An agency of the European Union. Dostęp: www.ecdc.europa.eu/en/surveillance-and-disease-data.
- [166]Salazar J. K., Gonsalves L. J., Natarajan V., Shazer A., Reineke K., Mhetras T., Sule C., Carstens C. K., Schill K. M., Tortorello M. L., 2020. Population

- Dynamics of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and Native Microflora During Manufacture and Aging of Gouda Cheese Made with Unpasteurized Milk. *Journal of Food Protection*, 83(2), 266-276. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-18-480.
- [167]Salejda A. M., Krasnowska G., 2014. Bioaktywne składniki jaja kurzego – możliwości aplikacyjne w biokonserwacji mięsa oraz jego przetworów. *Bromatologia i chemia toksykologiczna*, 1, 72-81.
- [168]Saludes M., Troncoso M., Figueroa G., 2015. Presence of *Listeria monocytogenes* in Chilean food matrices. *Food Control*, 50, 331-335.
- [169]Sant'Anna P. B., de Melo Franco B. D. G., Maffei D. F., 2020. Microbiological safety of ready-to-eat minimally processed vegetables in Brazil: an overview. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100 (13), 4664-4670. DOI: 10.1002/jsfa.10438.
- [170]São José J. F. B., Dantas Vanetti M. C., 2015. Application of ultrasound and chemical sanitizers to watercress, parsley and strawberry: Microbiological and physicochemical quality. *LWT - Food Science and Technology*, 63(2), 946-952. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.04.029.
- [171]Shahmohammadi A., 2017. Lysozyme separation from chicken egg white: a review. *European Food Research and Technology*, 244, 577–593.
- [172]Shanta S. M., Gopal S., 2014. Prevalence of *Listeria* Species in Environment and Milk Samples. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 2(5S), 1 – 4.
- [173]Shen A., Higgins D. E., 2005. The 5' untranslated region-mediated enhancement of intracellular listeriolysin O production is required for *Listeria monocytogenes* pathogenicity. *Molecular Microbiology*, 57(5), 1460-1473. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04780.x.
- [174]Shen J., Rump L., Zhang Y., Chen Y., Wang X., Meng J., 2013. Molecular subtyping and virulence gene analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from food. *Food Microbiology*, 35, 58-64.
- [175]Shin J. M., Gwak J. W., Kamarajan P., Fenno J. C., Rickard A. H., Kapila Y. L., 2016. Biomedical applications of nisin. *Journal of Applied Microbiology*, 120(6), 1449–1465, DOI: 10.1111/jam.13033.
- [176]Sip A., 2010. Bakterie *Listeria monocytogenes*. Cz. I. Występowanie i źródła zanieczyszczeń żywności. *Przemysł Spożywczy*, 64 (9), 40-43.
- [177]Skowron K., Hulisz K., Gryń G., Olszewska H., Wiktorczyk N., Paluszak Z., 2018. Comparison of selected disinfectants efficiency against *Listeria monocytogenes* biofilm formed on various surfaces. *International Microbiology*, 21, 23 – 33.
- [178]Skowron K., Wiktorczyk N., Grudlewska K., Wałęcka-Zacharska E., Paluszak Z., Kruszewski S., Gospodarek-Komkowska E., 2019. Phenotypic and genotypic evaluation of *Listeria monocytogenes* strains isolated from fish and fish processing plants. *Annals of Microbiology*, 69, 469 – 482.
- [179]Smith A., Moorhouse E., Monaghan J., Taylor C., Singleton I., 2018. Sources and survival of *Listeria monocytogenes* on fresh, leafy produce. *Journal of Applied Microbiology* 125, 930-942. DOI: 10.1111/jam.14025.
- [180]Softysiuk M. M., Sztetyn J., Wiszniewska-Łaszcznych A., 2019. Bakterie z rodzaju *Listeria* zagrożeniem dla zdrowia ludzi i zwierząt. *Medycyna Weterynaryjna*, 75 (4), 214-220.

- [181]Starostka D., Olejnik-Schmidt A., Schmidt M., 2014. Zastosowanie bakteriofagów jako środków ochrony żywności. Cz. 1. *Przemysł Spożywczy*, 68(2), 30-32.
- [182]Studzińska A., Tyburski J., Daca P., Tretyn A., 2008. PCR w czasie rzeczywistym. Istota metody i strategie monitorowania przebiegu reakcji. *Biotechnologia*, 80, 71-85.
- [183]Szafrńska J., Solowej B., 2018. Bakteriocynty - naturalna alternatywa. *Przegląd Mleczarski*, 03, 29-34.
- [184]Szczech M., Smolińska U., Kowalska B., Kosson R., Szwejda-Grzybowska J., Tuszyńska M., 2014. Zdrowa żywność: Mikrobiologiczne bezpieczeństwo w produkcji rolniczej. ISBN – 978-83-89800-60-2.
- [185]Szewczyk E. M., Dudkiewicz B., Kwaszewska A., Lisiecki P., Różalska M., Sobiś-Glinkowska M., Szarapińska-Kwaszewska J., Szemraj J., Szemraj M., Wysocki P., 2013. Diagnostyka bakteriologiczna, wyd. 2 zm. – 1 dodr. Wydawnictwo Naukowe PWN S. A., Polska.
- [186]Tamburro M., Ripabelli G., Fanelli I., Grasso G. M., Sammarco M. L., 2010. Typing of *Listeria monocytogenes* strains isolated in Italy by inlA gene characterization and evaluation of a new cost-effective approach to antisera selection for serotyping. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 1602 – 1611.
- [187]Tang J. Y. H., Razali N. A. S., Jalil L. A., Mat-Sa'ad S. H., Nakaguchi Y, Nishibuchi M., Radu S., 2017. Detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in vegetables by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and multiplex polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 9, 698 – 714.
- [188]The Rapid Alert System for Food and Feed, 2017 Annual Report. *Health and Food Safety, European Union*.
- [189]Tirumalai P. S., Prakash S., 2012. Expression of virulence genes by *Listeria monocytogenes* J0161 in natural environment. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 834 – 843.
- [190]Todd E.C.D., Notermans S., 2011. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 22, 1484–1490.
- [191]Toledo V., den Bakker H. C., Hormazábal J. C., González-Rocha G., BelloToledo H., Toro M., Moreno-Switt A. I., 2018. Genomic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from clinical and non-clinical samples in Chile. *Genes*, 9: 396. DOI: 10.3390/genes9080396.
- [192]Tomaszewska M., Grzesińska W., Bilaska B., Trafiałek J., 2014. Charakterystyka bakteriocyn jako naturalnych konserwantów żywności. *Postępy techniki przetwórstwa spożywczego*, 1, 84-89.
- [193]Van Schaik W., Gahan C. G., Hill C., 1999. Acid-adapted *Listeria monocytogenes* displays enhanced tolerance against the lantibiotics nisin and lactacin 3147. *Journal of Food Protection*, 62, 536–40.
- [194]Vanegas M. C., Medrano M. V., Martínez A. J., Arévalo S. A., 2012. Molecular serotyping and identification of the 85M arrangement in different Colombian isolates of *Listeria monocytogenes* strains: a descriptive study. *Colombia Médica*, 43, 38 – 45.
- [195]Vázquez-Boland J., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J., Kreft J., 2001. *Listeria*

- pathogenesis* and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 584 – 640.
- [196]Vázquez-Boland J., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J., Kreft J., 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 584 – 640.
- [197]Walczyccka M., 2005. Metody inaktywacji i hamowania wzrostu *Listeria monocytogenes* w przetworach mięsnych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, 43, 61–72.
- [198]Wang Y., Lu L., Lan R., Salazar J. K., Liu J., Xu J., Ye C., 2017. Isolation and characterization of *Listeria* species from rodents in natural environments in China. *Emerging Microbes & Infections*, 6: e44. DOI: 10.1038/emi.2017.28.
- [199]Wirtanen G., Salo S., 2003. Disinfection in food processing – efficacy testing of disinfectants. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2, 293–306.
- [200]Witte A. K., Fister S., Mester P., Schoder D., Rossmanith P., 2016. Evaluation of the performance of quantitative detection of the *Listeria monocytogenes* prfA locus with droplet digital PCR. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408, 7583 – 7593.
- [201]Wróblewska S., Misiewicz A., 2006. Wykrywanie i indentyfikacja *Listeria monocytogenes* w żywności. *Prace Instytutów i Laboratoriów Badawczych Przemysłu Spożywczego 2006 t. 61*.
- [202]Zarei M., Basiri N., Jamnejad A., Eskandari M. H., 2012. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Beef, Buffalo and Lamb Using Multiplex PCR. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(8), 7244. DOI: 10.5812/jjm.7244.
- [203]Zetzmann M., Sánchez-Kopper A., Waidmann M. S., Blombach B., Riedel C. U., 2016. Identification of the agr peptide of *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in Microbiology*, 7: 989. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00989.
- [204]Zhou X., Jiao X., 2003. Polymerase chain reaction detection of *Listeria monocytogenes* using oligonucleotide primers targeting actA gene. *Food Control*, 16, 125–130.
- [205]Zoz F., Grandvalet C., Lang E., Iaconelli C., Gervais P., Firmesse O., Guyot S., Beney L., 2017. *Listeria monocytogenes* ability to survive desiccation: Influence of serotype, origin, virulence, and genotype. *International Journal of Food Microbiology*, 248, 82-89. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.010.
- [206]Żabicka D., Literacka E., Bojarska K., 2012. MDR, XDR, PDR – jednolite, międzynarodowe definicje nabytej oporności drobnoustrojów na antybiotyki. *Aktualności Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków*, 3, 1 – 7.

STRESZCZENIE

Monitoring szczepów *Listeria monocytogenes* w surowcach, produktach i środowisku zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego

mgr inż. Martyna Zielińska-Tadych

Słowa kluczowe: *Listeria monocytogenes*, monitoring, warzywa, owoce,
zakłady przetwórcze

Producenci żywności zobligowani są do zadbania o odpowiednią jakość mikrobiologiczną wytwarzanych produktów spożywczych. Odbywa się to przez prowadzenie badań monitorujących obecność drobnoustrojów w środowisku produkcyjnym, surowcu oraz produkcie. Żywność pochodzenia roślinnego, niepoddawana obróbce termicznej jest szczególnie narażona na skażenie mikrobiologiczne na każdym etapie łańcucha żywnościowego, w tym w zakładach przetwórstwa owocowo-warzywnego. Wszechobecną w środowisku bakterią odpowiedzialną za zachorowania u ludzi jest *Listeria monocytogenes*. Jej szczególne właściwości adaptacyjne, takie jak oporność na krótkotrwałą pasteryzację, mrożenie, przeżywanie w warunkach chłodniczych, oporność na wiele środków dezynfekcyjnych i możliwość wytwarzania biofilmu sprawiają, że może być obecna w żywności i stanowić zagrożenie dla konsumentów. Listerioza została uznana za najbardziej śmiertelną chorobę odżywnościową wywoływaną przez patogeny jelitowe (śmiertelność 30%). Celem badań był monitoring zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego pod kątem występowania pałeczek *Listeria monocytogenes* w próbkach pobranych z surowców (warzyw), ze środowiska zakładów i z gotowych produktów (mrożonek, soków i surówek), a także charakterystyka fenotypowa i genotypowa bakterii polegająca na określeniu ich przynależności do serotypu, oznaczeniu genów wirulencji, zdolności do tworzenia biofilmu i wrażliwości na związki antybakteryjne. Przynależność rodzajową i gatunkową izolatów badano metodami hodowlanymi oraz molekularnymi z wykorzystaniem metody dupleks-PCR. Drogi transmisji bakterii na terenie zakładów przetwórczych określono oznaczając stopień podobieństwa genetycznego izolatów metodą RAPD, a serotypy i geny wirulencji szczepów *L. monocytogenes* oznaczono metodą multiplex-PCR. Zbadano także wrażliwość szczepów na wybrane czynniki antybakteryjne (nizyna, lizozym, bakteriofagi, środki dezynfekcyjne) określając ich minimalne stężenie hamujące i bakteriobójcze metodą mikropłytkową oraz na antybiotyki metodą krążkowo-dyfuzyjną. Wytwarzanie biofilmu na powierzchniach abiotycznych zakładów

przetwórczych jest bardzo powszechną cechą *L. monocytogenes*. W pracy zbadano zdolność szczepów do tworzenia tej struktury, a także określono wpływ na ten proces lizozymu, bakteriofagów i nizyny wykorzystując metodę mikroplótkową z fioletem krystalicznym. W niniejszej pracy poddano analizie 320 próbek pobranych z wymazów z linii technologicznych, elementów i powierzchni niemających bezpośredniego kontaktu z przetwarzaną żywnością, ze świeżych surowców i produktów oraz z mrożonek. Przy użyciu metod hodowlanych wyodrębniono z nich 92 izolaty *Listeria* spp., natomiast metoda dupleks-PCR wykazała, że do gatunku *L. monocytogenes* należały 73 izolaty. Pochodziły one najczęściej z mrożonych produktów (58,9%), następnie z wymazów z linii technologicznych (30,1%) oraz ze świeżych surowców i produktów (9,6%). Izolaty przyporządkowano do 41 szczepów, z których 13 obejmowało więcej niż jeden izolat. Ponad połowa szczepów należała do serotypu 1/2b-3b, a do serotypu 4b-4d-4e należały wyłącznie szczepy pochodzące z mrożonych produktów. Pałeczki *L. monocytogenes* charakteryzowały się zróżnicowanym profilem wirulencji i różną wrażliwością na działanie związków antybakteryjnych. Najbardziej odporne na działanie lizozymu, preparatu fagowego i nizyny były szczepy wyizolowane z mrożonek. W optymalnych warunkach wzrostowych (37°C) 46% badanych szczepów wykazywało silne i bardzo silne zdolności do tworzenia biofilmu (spośród których połowa należała do serotypu 1/2a-3a), natomiast w temperaturze 20°C szczepy wykazywały zróżnicowane zdolności do formowania tej struktury. Wszystkie zastosowane substancje antybakteryjne (nizyna, lizozym i bakteriofag) hamowały zarówno proces formowania biofilmu, jak i wpływały na jego eradykację w obu temperaturach (20°C i 37°C) ($p \leq 0,05$), co sugeruje możliwość ich wykorzystania do podniesienia skuteczności dezynfekcji linii produkcyjnej i zapobiegania rozprzestrzenianiu się *L. monocytogenes* w środowisku zakładów i produktach. Ponad 30% szczepów charakteryzowało się opornością na wybrane antybiotyki stosowane w leczeniu listeriozy. Analizy pokrewieństwa genetycznego izolatów wskazały, że potencjalną drogą transmisji pałeczek *L. monocytogenes* na teren zakładu były świeże surowce, skąd bakterie trafiały na powierzchnie i elementy linii technologicznych przyczyniając się skażenia gotowych produktów. Zastosowane w zakładach zabiegi czyszczenia i dezynfekcji okazały się niewystarczające, aby skutecznie ograniczyć transmisję *L. monocytogenes*. Wyniki badań wskazują, że rozwój bakterii najskuteczniej ograniczały chlorowce oraz związki utleniające. Wyniki badań pozwoliły na pełniejszą charakterystykę badanych bakterii i mogą przyczynić się do poprawy stanu środowiska produkcyjnego i żywności, a tym samym na zmniejszenie ryzyka zachorowania konsumentów. Zaleca się kontynuowanie monitoringu badanych obiektów.

ABSTRACT

Monitoring of *Listeria monocytogenes* strains in raw materials, products and environment of fruit and vegetable processing plants

MSc Martyna Zielińska-Tadych

Key words: *Listeria monocytogenes*, monitoring, vegetables, fruits, processing plants

Food manufacturers are obliged to ensure the microbiological quality of the food products they produce. This is done by conducting tests to monitor the presence of microorganisms in the production environment, raw material and product. Food of plant origin, not subjected to heat treatment, is particularly vulnerable to microbiological contamination at every stage of the food chain, including in fruit and vegetable processing plants. The ubiquitous in the environment, the bacterium responsible for human illness is *Listeria monocytogenes*. Its special adaptive properties, such as resistance to short-term pasteurization, freezing, survival in refrigeration, resistance to many disinfectants and the ability to produce biofilm make it likely to be present in food and pose a threat to consumers. Listeriosis has been recognized as the most deadly foodborne disease caused by enteric pathogens (mortality rate of 30%). The purpose of the study was to monitor fruit and vegetable processing plants for the presence of *Listeria monocytogenes* bacilli in samples taken from raw materials (vegetables), from the plant environment and from finished products (frozen foods, juices and salads), as well as phenotypic and genotypic characterization of the bacteria by determining their serotype affiliation, virulence genes, biofilm-forming ability and sensitivity to antibacterial compounds. Genus and species affiliation of isolates was studied by culture and molecular methods using duplex-PCR. Bacterial transmission routes within the processing plants were determined by determining the degree of genetic similarity of the isolates using the RAPD method, and the serotypes and virulence genes of *L. monocytogenes* strains were determined by multiplex-PCR. The sensitivity of the strains was also investigated to selected antibacterial agents (nisin, lysozyme, bacteriophages, disinfectants) by determining their minimum inhibitory and bactericidal concentrations using the microplate method and to antibiotics using the disc-diffusion method. Biofilm production on abiotic surfaces of processing plants is a very common feature of *L. monocytogenes*. The study investigated the ability of strains to form this structure, and determined the effect of lysozyme, bacteriophages and nisin on this process using the crystal violet microplate method. The present study analyzed

320 samples taken from swabs from process lines, components and surfaces not in direct contact with processed food, from fresh raw materials and products, and from frozen food. Using culture methods, 92 *Listeria* spp. isolates were isolated from them, while the duplex-PCR method showed that 73 isolates belonged to the *L. monocytogenes* species. They were mostly derived from frozen products (58.9%), followed by from process line swabs (30.1%) and from fresh raw materials and products (9.6%). The isolates were assigned to 41 strains, 13 of which included more than one isolate. More than half of the strains belonged to serotype 1/2b-3b, and serotype 4b-4d-4e included only strains from frozen products. *L. monocytogenes* bacilli were characterized by a diverse virulence profile and varying sensitivity to antibacterial compounds. Strains isolated from frozen foods were the most resistant to lysozyme, phage preparation and nisin. Under optimal growth conditions (37°C), 46% of the strains tested showed strong and very strong biofilm-forming abilities (of which half belonged to serotype 1/2a-3a), while at 20°C the strains showed varying abilities to form this structure. All the antibacterial substances used (nisin, lysozyme and bacteriophage) both inhibited biofilm formation and influenced biofilm eradication at both temperatures (20°C and 37°C) ($p \leq 0.05$), suggesting that they could be used to increase the efficiency of production line disinfection and prevent the spread of *L. monocytogenes* in the plant environment and products. More than 30% of the strains were characterized by resistance to selected antibiotics used to treat listeriosis. Genetic affinity analyses of the isolates indicated that a potential route of transmission of *L. monocytogenes* bacilli to the plant site was fresh raw materials, from where the bacteria ended up on surfaces and process line components contributing to contamination of finished products. The cleaning and disinfection proved insufficient to effectively reduce the transmission of *L. monocytogenes*. The results of the study indicate that the growth of the bacteria was most effectively limited by halogens and oxidizing compounds. The results of the study allowed for a more complete characterization of the bacteria studied and can contribute to the to the improvement of the production environment and food, thus on reducing the risk of illness for consumers. It is recommended to continue monitoring the studied facilities.