

579.869.1 : 641

N. 57496

Oz
215662

AKADEMIA ROLNICZA W SZCZECINIE
WYDZIAŁ NAUK O ŻYWNOŚCI I RYBACTWA

Robert Iwaszki

ZMIENNOŚĆ CECH POWIERZCHNIOWYCH
LISTERIA MONOCYTOGENES POD WPŁYWEM
WARUNKÓW ŚRODOWISKOWYCH

1115
1115
SZCZECIN 2002

AKADEMIA ROLNICZA W SZCZECINIE
WYDZIAŁ NAUK O ŻYWNOSCI I RYBACTWA

Robert Iwański

ZMIENNOŚĆ CECH POWIERZCHNIOWYCH
LISTERIA MONOCYTOGENES POD WPŁYWEM
WARUNKÓW ŚRODOWISKOWYCH

D-1115



MFN 7278

SZCZECIN 2002

WYDZIAŁ NAUK O ŻYWIENIU I RYBACTWA
AKADEMIA ROLNICZA W SZCZECINIE

Robert Iwański



C2.57496

WARUNKÓW ŚRODOWISKOWYCH
LISTERIA MONOCYTOGENES POD WPŁYWEM
ZMIENNOŚĆ CECH POWIERZCHNIOWYCH

~~1-1115~~
MFM 42.18

SZCZECIN 8003

D.0117/2015

SPIS TREŚCI

1 WSTĘP	4	
1.1 Ogólna wiadomości o <i>Listeria monocytogenes</i>	4	
1.2 Zasiękanie środowisk naturalnych	10	
1.3 Fizykochemiczne mechanizmy procesu adhezji drożdżoustrojów	13	
1.4 Hygryfobowość i adhezynność i patogeniczność	19	
2 CEL PRACY	26	
3 MATERIAŁY I METODY	27	
3.1 Szczepki <i>Listeria monocytogenes</i> użyte do badań	27	
3.2 Izolacja szczepów <i>Listeria monocytogenes</i> z żywności	27	
3.2.1 Metoda API	28	
3.2.2 Metoda PCR	28	
3.2.3 Identyfikacja serologiczna szczepów <i>Listeria monocytogenes</i>	29	
3.3 Wyznaczenie wpływu logarytmicznego wzrostu	30	
3.4 Ocena wpływu pH na hydrofobowość <i>L. monocytogenes</i>	30	
3.5 Wpływ wiskozycji roztworu na hydrofobowość <i>L. monocytogenes</i>	31	
3.6 Ocena wpływu szczepów <i>Listeria monocytogenes</i> do osłonki kiebas	32	
3.6.1 Wpływ wiskozycji roztworu i temperatury procesu adhezji	33	
3.6.2 Wpływ warunków bezionowych	33	
3.6.3 Ocena wpływu szczepów <i>Listeria monocytogenes</i> do osłonki kiebas produkcji w warunkach przemysłowych	34	
3.7 Ciężarówki <i>Listeria monocytogenes</i> w śladziach i wymbach trzasy	35	
3.8 Obliczenia statystyczne	36	
4 WYNIKI	37	
4.1 Wyniki badań fizycznego namnożenia <i>Listeria monocytogenes</i>	37	
4.2 Wpływ wiskozycji roztworu na hydrofobowość <i>Listeria monocytogenes</i>	37	
4.2.1	Pracę wykonano w Katedrze Mikrobiologii Żywności	37
4.2.2	Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa	38
4.2.3	Akademii Rolniczej w Szczecinie	39
4.2.4		40
4.2.5		40
4.2.6		40
4.3 Ciężarówki <i>Listeria monocytogenes</i> w śladziach i wymbach trzasy	41	
4.3.1		46
4.3.2		47
4.3.3		49
4.4 Ocena wpływu szczepów <i>Listeria monocytogenes</i> do osłonki kiebas	49	
5 DYSKUSJA	52	
6 WNIOSKI	57	
7 PISMENNICTWO	58	
8 TABELLE	59	
9 RYCINY		

Podziękowania:

Promotorowi Prof. dr hab. Waldemarowi Dąbrowskiemu oraz wszystkim pracownikom Katedry Mikrobiologii Żywności za pomoc w realizacji pracy.

Moim Najbliższym dziękuję za wsparcie i cierpliwość.

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	4
1.1. Ogólne wiadomości o <i>Listeria monocytogenes</i>	4
1.2. Zasiedlanie środowisk naturalnych	10
1.3. Fizykochemiczne mechanizmy procesu adhezji drobnoustrojów	13
1.4. Hydrofobowość a adhezyjność i patogenność	19
2. CEL PRACY	25
3. MATERIAŁY I METODY	27
3.1. Szczepy <i>Listeria monocytogenes</i> użyte do badań	27
3.2. Izolacja szczepów <i>Listeria monocytogenes</i> z żywności	27
3.2.1. Metoda API	28
3.2.2. Metoda PCR	28
3.2.3. Identyfikacja serologiczna szczepów <i>Listeria monocytogenes</i>	29
3.3. Wyznaczanie krzywej logarytmicznego wzrostu	30
3.4. Ocena hydrofobowości szczepów <i>Listeria monocytogenes</i>	30
3.5. Wpływ warunków hodowli na hydrofobowość <i>L. monocytogenes</i>	31
3.6. Ocena adhezji szczepów <i>Listeria monocytogenes</i> do osłonek kielbas	32
3.6.1. Wpływ temperatury hodowli i temperatury procesu adhezji	33
3.6.2. Wpływ warunków beztlenowych	33
3.6.3. Ocena adhezji szczepów <i>Listeria monocytogenes</i> do osłonek kielbas powleczonych filmem tłuszczowym	34
3.7. Oznaczanie ilości <i>Listeria monocytogenes</i> w śledzionach i wątrobach myszy	35
3.8. Obliczenia statystyczne	36
4. WYNIKI	37
4.1. Krzywa logarytmicznego wzrostu <i>Listeria monocytogenes</i>	37
4.2. Wpływ warunków hodowli na hydrofobowość <i>Listeria monocytogenes</i>	37
4.2.1. Czas hodowli	37
4.2.2. Temperatura hodowli	38
4.2.3. Rodzaj podłoża	38
4.2.4. pH podłoża	39
4.2.5. Wpływ dodatku NaCl	40
4.2.6. Wpływ warunków beztlenowych	40
4.2.7. Adhezyjność <i>Listeria monocytogenes</i> do oleju roślinnego	40
4.3. Ocena wpływu warunków środowiskowych na adhezję szczepów <i>Listeria monocytogenes</i> do osłonek kielbas	41
4.3.1. Wpływ temperatury hodowli i temperatury procesu adhezji	41
4.3.2. Wpływ warunków beztlenowych	46
4.3.3. Wpływ powleczenia osłonek filmem tłuszczowym	47
4.4. Ocena patogenności <i>Listeria monocytogenes</i> dla myszy	49
5. DYSKUSJA	52
6. WNIOSKI	67
7. PIŚMIENNICTWO	68
8. TABELI	81
9. RYCINY	83

1. WSTĘP

1.1. Ogólne wiadomości o *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes jest małą Gram-dodatnią, niezarodnikującą, niekwasooporną, względnie beztlenową pałeczką o zaokrąglonych biegunach. Bakteria ta została wyizolowana pierwszy raz z wątroby królika w Szwecji w 1911 roku (Miller i wsp., 1990). W 1924 roku Murray dokładnie opisał te drobnoustroje i nadał im nazwę „*Bacterium monocytogenes*”. W 1927 roku nazwę zmieniono na „*Listerella monocytogenes*” na cześć Lorda Josepha Listera twórcy antyseptyki (1827-1912). W 1929 roku stwierdzono ich patogenność dla ludzi. W 1940 roku nazwę ponownie zmieniono na „*Listeria monocytogenes*” (MSU internet page 2002). Nazwa gatunkowa „*monocytogenes*” pochodzi od wzrostu ilości monocytów we krwi w trakcie rozwoju zakażenia (Bell i wsp., 1998). Długość komórek waha się od 1 μ m do 2 μ m a szerokość sięga 0,5 μ m. Zazwyczaj nie wytwarza otoczki, jest urzęsiona, lecz typ urzęsienia nie został ostatecznie wyjaśniony. Niektóre szczepy mogą rosnąć w postaci długich pałeczek, o długości od 5 μ m do 7 μ m, czasami listerie tworzą krótkie łańcuszki lub rosną w postaci owalnych ziarniaków (Kędzia i wsp., 1974).

Listeria monocytogenes jest mikroorganizmem bardzo łatwo adoptującym się w środowisku. Wzrost tego drobnoustroju zachodzi w szerokim zakresie temperatur od 2^oC do 45^oC (Bayles i wsp., 1996). Jest on w stanie wytrzymać znaczne zasolenie środowiska dochodzące do 30% (Doyle i wsp., 1997) przy temperaturze -0,1^oC (Smith, 1996, Wemekamp-Kamphuis i wsp., 2002), zaś rozwija się przy koncentracji NaCl do 10% (Chodorowska i wsp., 2002, Wemekamp-Kamphuis i wsp., 2002). Drobnoustroje tego gatunku nie giną w czystej soli kuchennej po przechowywaniu przez 150 dni w temperaturze 22^oC (Gnuanou Besse i wsp., 2000). Bakteria ta toleruje stosunkowo niskie pH: jest w stanie przetrwać pH 3,5 po uprzedniej adaptacji w pH 5,5 (O'Disccoll i wsp., 1996). *Listeria monocytogenes* wykazuje zdolność ruchu w temperaturze 20^oC-25^oC (Holt i wsp., 1994) ponieważ tylko w tym zakresie temperatur wytwarzane są rzęski.

Napotkawszy sprzyjające warunki w makroorganizmie, np.: stan zachwiania odporności ustroju, uszkodzenie tkanek przez inne czynniki, *Listeria monocytogenes* namnaża się i wywołuje ciężkie schorzenia określane mianem listeriozy. *Listeria monocytogenes* rozwija się wewnątrz makrofagów, monocytów i granulocytów

obojętnochłonnych. Komórki te mają za zadanie eliminację drobnoustrojów z organizmu, jednak *Listeria monocytogenes* nie podlega temu procesowi gdyż rozwinęła mechanizm zapobiegający jej niszczeniu (Furowicz 1992, Braun 1998). Pałeczki listerii dostają się do organizmu ludzi i zwierząt najczęściej drogą pokarmową (ponad 30% przypadków), rzadziej przez łożysko, spojówki, uszkodzoną skórę, drogi oddechowe, w czasie stosunku płciowego lub przez ukłucie owadów (Kampelmacher i Van Noorlen Jansen, 1980, Kwiatek i wsp., 1989, Hird i Geonigeorgias, 1990, McCarthy, 1990). Pierwsze doniesienie, w którym sugeruje się listerie jako czynnik patogenny, związany z niemożnością urodzenia zdrowego potomka przez Królową Annę, pomimo 17 ciąż i porodów, datowane jest na rok 1702 i pochodzi z Anglii, (MSU internet page 2002). Po raz pierwszy syndrom listeriozy został rozpoznany u owiec w Niemczech w 1925 roku, a najwcześniejszy opisany przypadek listeriozy u ludzi pochodzi z Nyfeldt z 1929 roku (Miller i wsp., 1990). Pokarmowa droga została stwierdzona w 1953 roku (McCarthy, 1990). Z kolei jedną z największych epidemii wywołaną przez *Listeria monocytogenes* (279 osób chorych), spowodowaną prawdopodobnie spożyciem produktów pochodzenia zwierzęcego odnotowano w byłej NRD w latach 60-tych (Kwiatek i wsp., 1989). Pałeczki *L. monocytogenes* wywołują zapalenie mózgu i opon mózgoworzeniowych u zwierząt, głównie u owiec i kotów, mogą również wywoływać u nich poronienia. Listerioza charakteryzuje się niską zapadalnością, a wysoką śmiertelnością: od 20% do 50%, szczególnie w przypadku infekcji centralnego układu nerwowego (Chodorowska i wsp., 2002).

W związku z różnymi drogami zakażenia wyróżnia się dwa rodzaje listeriozy: nabytą i wrodzoną. Zakażenie w listeriozie nabytej następuje drogą pokarmową – ponad 30% przypadków (Hird, Geonigeorgias, 1990). W listeriozie wrodzonej odbywa się ono przez łożysko, przy czym zakażenie u kobiety ciężarnej także zachodzi drogą pokarmową.

Tab. 1. Choroby wywołane przez *Listeria monocytogenes* (Bell, Kyriakides, 1998)

Typ infekcji	Natura infekcji	Intensywność	Czas inkubacji
Odzwierzęca	Miejscowa infekcja uszkodzeń skóry	Łagodna i samoustępująca	1 – 2 dni
Noworodkowa	Zakażenie od matki podczas porodu lub od innych noworodków w okresie pobytu w szpitalu	Wyjątkowo ostra postać, prowadząca do posocznicy, zapalenia opon mózgowych, śmierci	1 – 2 dni (wczesna inkubacja), zazwyczaj infekcja wrodzona poprzedzająca narodziny 5 – 12 dni (późna inkubacja) po zarażeniu od innego noworodka
Listerioza ciężarnych	Na skutek spożycia zakażonego pokarmu	Łagodna, podobna do grypy, nie wykazuje symptomów u matki, lecz ma poważny wpływ na nienarodzone dziecko włączając poronienie, śmierć płodu, urodzenie martwego dziecka, zapalenie opon mózgowych. Infekcja jest częstsza w 3. trymestrze ciąży.	od 1 dnia do kilku miesięcy
U dorosłych nie ciężarnych	Na skutek spożycia zakażonego pokarmu	Przebiega bez symptomów lub łagodnie. Może rozwijać się jako infekcja centralnego układu nerwowego takie jak zapalenie opon mózgowych. Częściej występuje u osób starszych lub o osłabionym systemie immunologicznym	Pojawia się w ciągu jednego dnia lub po kilku miesiącach
Zatrucie pokarmowe	Spożycie pokarmu o wyjątkowo wysokim poziomie <i>Listeria monocytogenes</i> > 10 ⁷ na ml	Wymioty, biegunka, temperatura, czasami przechodzi w bakteriemię, ale zazwyczaj samoustępująca	24 godziny po konsumpcji

Przy zakażeniach drogą pokarmową pierwszym etapem jest kolonizacja pałeczkami listerii powierzchni jelita cienkiego. Drugim etapem jest inwazja bakterii w głąb ściany jelita poprzez barierę nabłonkową a następnie do krwi i różnych narządów. Duża ilość tego drobnoustroju gromadzona jest w komórkach parenchymalnych wątroby i śledziony (Rocourt i Cossart, 1997).

Klasyczna już dziś listerioza noworodków jest postacią wrodzoną lub zakażeniem pozapłodowym. Pałeczki *L. monocytogenes* znajdują się na liście najważniejszych bakteryjnych zakażeń okołoporodowych. Mogą powodować poronienia, porody przedwczesne, a także postacie posocznicowe płodu, które są w obrazie klinicznym i histopatologicznym swoiste dla zakażenia tym gatunkiem.

W ostatnich dekadach opisano w wielu krajach liczne przypadki posocznic płodu kończące się zejściem śmiertelnym, a także posocznicy u noworodków, kobiet ciężarnych i osób dorosłych, głównie u pacjentów z obniżoną odpornością (np. marskość wątroby). Do groźnych dla życia należą również przypadki zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu. Inne postacie listeriozy u ludzi: zmiany skórne, zapalenie spojówek, węzłów chłonnych, wsierdzia, otrzewnej, szpiku i kości, płuc oraz zapalenia żołądkowo-jelitowe są znacznie rzadsze (Zaręba i wsp., 1997). U ludzi przypadki listeriozy były do niedawna rejestrowane stosunkowo rzadko i do 1985 roku nie stanowiły problemu epidemiologicznego. Wyraźny wzrost liczby zachorowań zaczęto notować na przełomie lat 70 i 80 ubiegłego stulecia w wielu krajach Europy, USA i Kanady. Z uzyskanych w tym okresie danych epidemiologicznych wynika, że najczęściej do zakażenia dochodzi drogą pokarmową. Głównym źródłem zakażenia jest żywność pochodzenia zwierzęcego zanieczyszczona zjadliwymi szczepami *L. monocytogenes* serotyp 4 (4b) lub 1 (1/2a, 1/2b) (Kwiatek, 1993). Wzrost liczby zachorowań na listeriozę jest wynikiem różnorodnych elementów życia społecznego. Przyczynia się do tego także ciągły postęp w medycynie, zmiany demograficzne (wzrost liczby ludzi o znacznym osłabieniu układu odpornościowego) oraz przemiany w procesach produkcji żywności, wyrażające się zwiększeniem skali produkcji oraz modyfikacją procesów technologii produkcji żywności, szczególnie w zakresie przechowywania. Inną przyczyną może być wytwarzanie form VNC (viable not culturable) *L. monocytogenes* co może tłumaczyć zjawisko długotrwałego bytowania tego mikroorganizmu w niekorzystnych warunkach (Doyle i wsp., 1997). Obecnie zapadalność na listeriozę w USA i krajach Europy Zachodniej jest znacznie wyższa niż w Polsce. W roku 1990 w Europie Zachodniej i USA wskaźnik zachorowania wahał się od 4 do 8 przypadków na milion mieszkańców (Bille, 1990). Najwyższą wartość osiągnął we Francji – 12 przypadków na milion mieszkańców. W Polsce natomiast od czasu wprowadzenia monitoringu tego drobnoustroju obserwuje się jedynie pojedyncze przypadki zachorowań zarówno u ludzi jak i zwierząt, jednak do tej pory nie odnotowano przypadku epidemii. W latach 1991-2000 zarejestrowano w Polsce 52 przypadki listeriozy (Chodorowska i wsp., 2002). W przeliczeniu na milion mieszkańców jest to wynik dziesięciokrotnie niższy w porównaniu z krajami Ameryki Północnej i Europy Zachodniej. Trudno jest wyjaśnić tak niską zapadalność na listeriozę w Polsce w porównaniu z krajami Europy Zachodniej.

Mechanizmy patogenności *Listeria monocytogenes* nie są do dzisiaj dokładnie poznane. Genom *L. monocytogenes* ma długość 3150 ± 50 par zasad (Michel i Cossart, 1992). Wszystkie znane geny wirulencji *Listeria monocytogenes* zlokalizowane są w chromosomie bakteryjnym. Sześć z nich (*plcA*, *prfA*, *hly*, *mpl*, *actA* i *plcB*) zajmuje obszar między genem dehydrogenazy mleczanowej (*ldh*) i genem syntetazy fosforybozylu (*prs*) (Dickneite i wsp., 1998). W osobnym rejonie chromosomu leży operon *inlA-inlB* oraz gen *iap*. Produkty tych genów są niezbędne dla prawidłowego przebiegu cyklu życiowego *Listeria monocytogenes* (Dickneite i wsp., 1998). W skład procesu zakażenia wchodzi wiele czynników takich jak: proces wnikania drobnoustroju do organizmu, stężenie inoculum, patogenność oraz specyfika poszczególnych szczepów (Bell i wsp., 1998) oraz dotychczas poznane czynniki patogenności (wirulencji). Można tutaj wymienić:

- Listeriozynę O jako główny i najdokładniej scharakteryzowany czynnik wirulencji. Jest to białko o masie 58 kDa (produkt genu *hlyA*) składające się z 529 aminokwasów. Listeriozyna O posiada zdolność tworzenia por w błonie cytoplazmatycznej fagosomu po fagocytozie pałeczek *Listeria monocytogenes* przez komórki gospodarza, co umożliwia rozprzestrzenianie się i namnażanie w cytoplazmie.
- Białko ActA o masie 90 kDa, składające się z 610 aminokwasów. Czynniki ten pobudza polimeryzację i gromadzenie się włókienek aktyny w komórce gospodarza, dzięki czemu pałeczki *Listeria monocytogenes* mogą poruszać się w cytoplazmie i przechodzić z jednej komórki eukariotycznej do drugiej.
- Fosfolipaza C specyficzna dla fosfatydyloinozytolu wytwarzana nie tylko przez *Listeria monocytogenes*, ale również przez inne bakterie Gram-dodatnie.
- Fosfolipaza PI-PLC powodująca wraz z listeriozyną O lizę fagosomu i umożliwiającą wydostawanie się pałeczek *Listeria monocytogenes* do cytoplazmy komórki gospodarza.
- Internaliny InlA i InlB, odpowiedzialne za przyleganie oraz wtargnięcie pałeczek *Listeria monocytogenes* do komórek eukariotycznych. Internalina InlA jest niezbędna do wnikania bakterii do komórek nabłonkowych, natomiast internalina InlB do komórek wątroby.

- Białko p60 o masie 60 kDa składające się z 484 aminokwasów będące produktem zewnątrzkomórkowym. Wykazuje ono aktywność hydrolazy mureiny niezbędnej podczas podziału komórkowego, a także wraz z internalinami bierze udział w przyleganiu *Listeria monocytogenes* do komórek eukariotycznych oraz pobudza fagocytozę tych bakterii (Chodorowska M. i wsp., 2002).

Geny kodujące te produkty występują w tzw. wyspach patogenności (Vázquez-Boland i wsp., 2001). Są to regiony chromosomu bakteryjnego wykazujące cechy specyficzne:

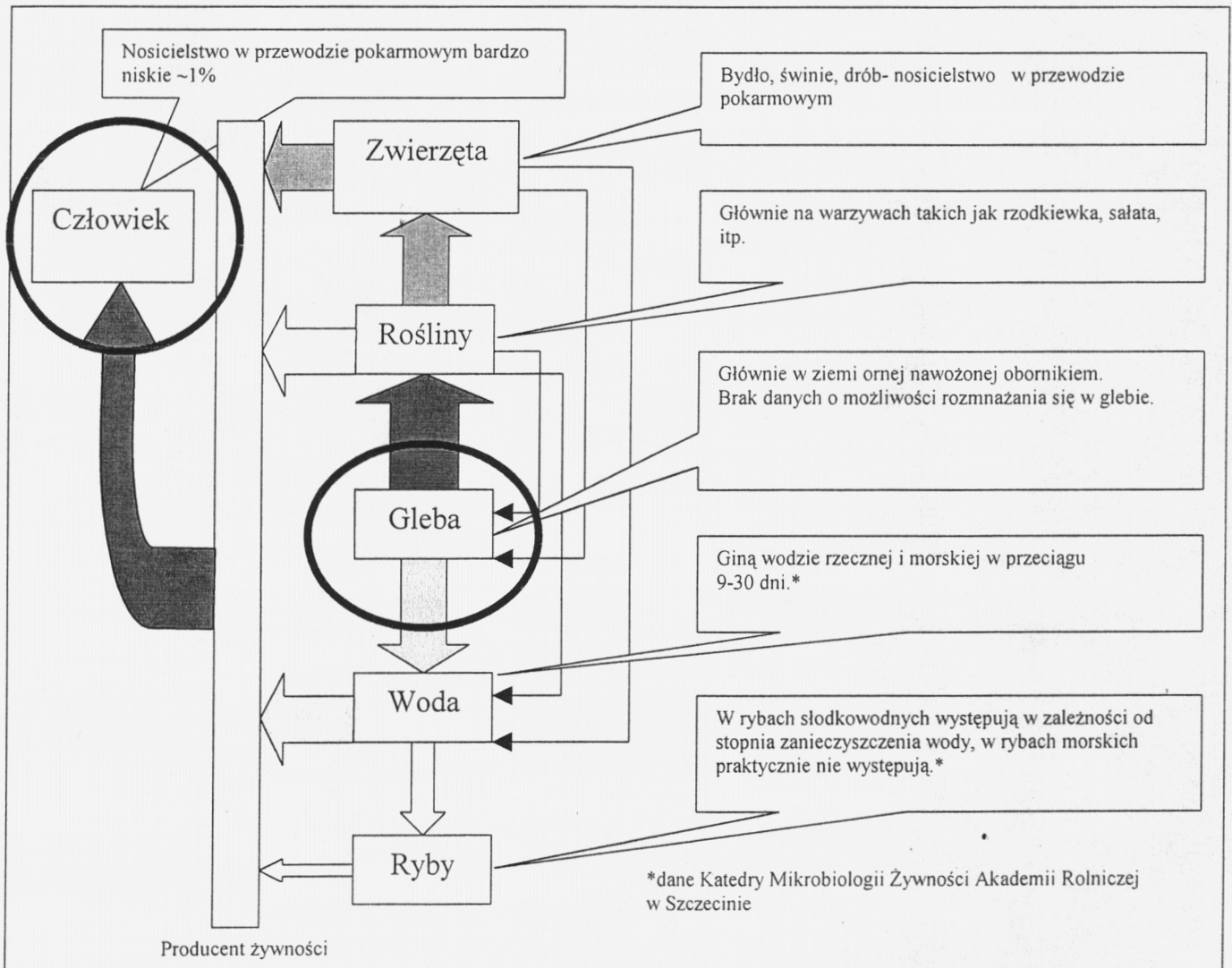
- niosą geny kodujące czynniki wirulencji między innymi toksyny, adhezyny, systemy sekrecji białek i pozyskiwania żelaza,
- są obecne w szczepach patogennych, a sporadycznie występują w szczepach niepatogennych,
- mają odmienną zawartość molową par G+C niż reszta DNA bakteryjnego i różnią się wyborem kodonu,
- zajmują obszerny fragment chromosomu,
- są często ograniczone przez sekwencje powtórzone proste, będące efektem integracji DNA niosącego PAI z chromosomem gospodarza,
- występują często w pobliżu genów *tRNA*,
- zawierają kryptyczne bądź funkcjonalne geny warunkujące mobilność,
- są względnie niestabilne (Mokracka i wsp., 2002).

Według Mokrackiej, u *Listeria monocytogenes* wyspą taką jest region *prf-vir* kodujący funkcje listeriozyny i fosfolipazometaloproteazy (Mokracka i wsp., 2002).

Pomimo, że szczepy *Listeria monocytogenes* izolowane z przypadków klinicznych oraz z żywności spożywanej przez konsumentów wykazują podobne cechy patogenności, nie wiadomo dlaczego jest tak niska liczba zachorowań. Najprawdopodobniej tak niską zapadalność warunkują inne nieznanne dotychczas cechy rodzaju *Listeria*. Jednym z mechanizmów patogenności mogą być także zmiany hydrofobowości i adhezynności tego drobnoustroju. Wynika stąd wniosek o celowości prowadzenia dalszych, wnikliwych badań nad *Listeria monocytogenes*.

1.2. Zasiedlanie środowisk naturalnych

Listeria monocytogenes jest drobnoustrojem szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie. Bakterie te są saprofitami i łatwo wyhodować je można z osadów i substancji gnijących. Przeżywają i rozmnażają się prawie w każdym środowisku tak długo jak obecna jest w nim wilgoć. Mallory wyizolował listerie z rzecznych osadów przybrzeżnych poprzez przedłużoną inkubację (28 dni) na pożywce bogatej w składniki odżywcze. Ich powolny wzrost na tej pożywce sugeruje, że wymagają czasu do metabolicznej adaptacji do nowych warunków pokarmowych (Mallory, 1977). Najczęściej bywają izolowane z gleby, wody, osadów dennych, ścieków, roślin oraz przewodów pokarmowych zwierząt występujących na wszystkich kontynentach. Wyjątek stanowi obszar Antarktyki (Miller i wsp., 1990). Na ryc. 1. przedstawiono własny schemat krążenia listerii w przyrodzie.



Ryc.1. Drogi przemieszczania się listerii w środowisku.

Tak szerokie występowanie *Listeria spp.* w różnorodnych środowiskach wskazuje na bardzo dobre zdolności adaptacyjne tych drobnoustrojów. W przypadku środowisk wodnych ich obecność notuje się zarówno w akwenach o bardzo dużej czystości oraz wodach o mniejszej czystości, takich jak zamknięte wody stojące, poldery, kanały i jeziora. Jest także izolowana ze środowisk morskich jednakże brak jest danych o ich występowaniu w wodach morskich otwartych. Dane te nie znajdują potwierdzenia w szeroko prowadzonych badaniach w Katedrze Mikrobiologii Żywności Akademii Rolniczej w Szczecinie. *Listeria monocytogenes* bardzo często występuje w organizmach zwierzęcych pochodzenia morskiego, jak np. małże, (Colburn i wsp., 1990, Boerlin i wsp., 1997, Sikorski, 1996, Heinitz i wsp., 1998). Poprzez środowisko wodne dostaje się także do organizmów zwierząt domowych (Colburn i wsp., 1990). *Listeria monocytogenes* jest izolowana z przewodów pokarmowych zwierząt rzeźnych oraz mlecznych, skąd przy braku odpowiedniej higieny produkcji przenoszona jest na wyroby żywnościowe pochodzące od wyżej wymienionych grup zwierząt. Za źródło zakażenia organizmów lądowych powszechnie uważa się glebę skąd listerie przenoszone są na rośliny jadalne, które to infekują organizmy wyższe jak i człowieka. Bardzo często w cyklach tych umieszcza się ptactwo (Miller i wsp., 1990). Ważnym środowiskiem występowania *Listeria monocytogenes* w dużej ilości są odpady komunalne gospodarstw domowych jak i poprodukcyjne (stałe i ciekłe). Stąd bakterie mogą przedostawać się bezpośrednio do gleby i na rośliny w przypadku zasilania pól i łąk nawozem pochodzącym z odchodów zwierzęcych (Miller i wsp., 1990).

Innym problemem wywoływanym przez *Listeria monocytogenes* jest zasiedlanie środowisk związanych z przetwórstwem żywności. To zjawisko jest szczególnie niebezpieczne, gdyż źródłem większości epidemii listeriozy u ludzi były produkty żywnościowe, zaś u zwierząt pasza zwierzęca w postaci kiszonek. Inną przyczyną zwiększonej ilości zachorowań na listeriozę może tkwić w nowych metodach pakowania i przechowywania. Wpływ ten może być szczególnie niebezpieczny w przemyśle masarskim, gdzie obecność wody wzbogaconej w substancje odżywcze, obecność substancji hydrofobowych jak i różnych temperatur produkcji stwarza optymalne warunki do bytowania i szybkiego namnażania *Listeria monocytogenes*.

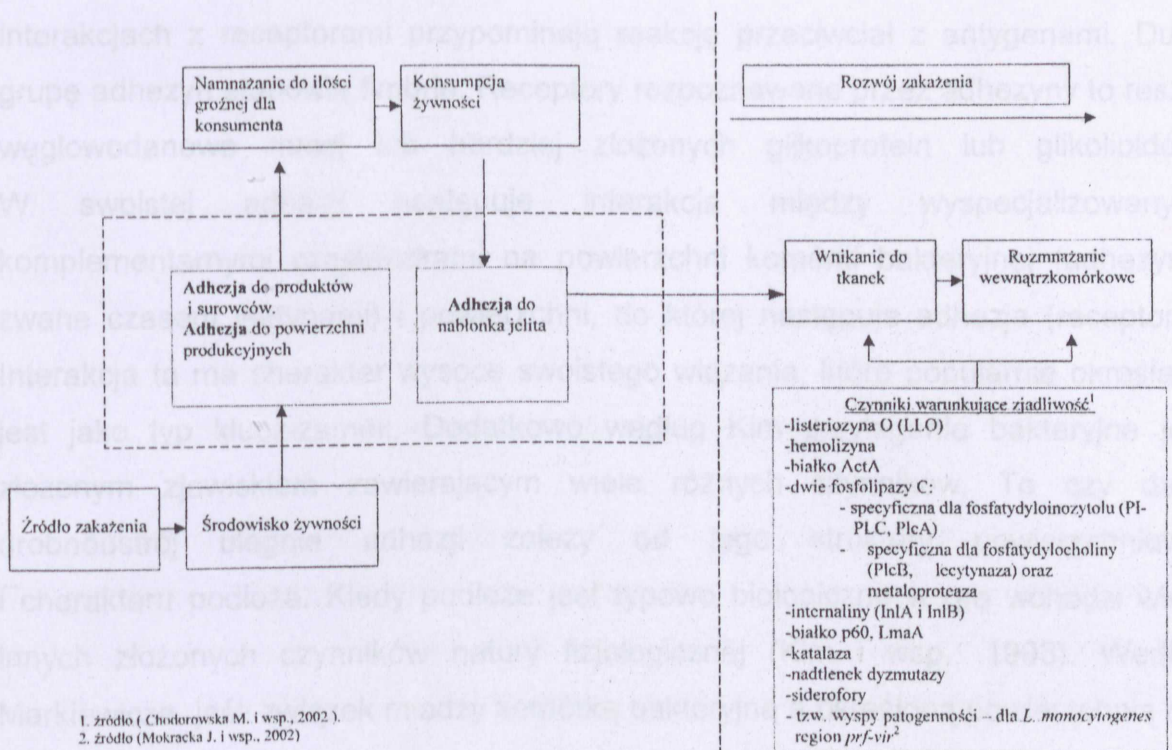
Listeria monocytogenes jest wyjątkowo oporną bakterią. Wykazuje znaczną oporność na środki odkażające stosowane w urządzeniach do obróbki żywności.

Uporczywe bytowanie w niektórych środowiskach *Listeria monocytogenes* i innych gatunków listerii może być spowodowane ich zdolnością do formowania warstwy biofilmu na różnych powierzchniach. *Listeria monocytogenes* jest również bakterią o wysokich zdolnościach adaptacyjnych. Ma zdolność wzrostu w niskich temperaturach, co sprawia, że jest szczególnie kłopotliwa w przemyśle spożywczym.

Mało jest danych dotyczących rozwoju *Listeria monocytogenes* na powierzchniach środowiskowych. Kilka raportów informuje o formowaniu biofilmów oraz przyleganiu do różnych powierzchni przez *Listeria monocytogenes*. Knight badał wpływ czasu inkubacji na zdolność wzrostu szczepów *Listeria monocytogenes* izolowanych z zakładów przemysłu spożywczego (Knight, 1988). Porównanie danych z roku 1986 i 1987 doprowadziło autorów do wniosku, że chemiczne środki odkażające uszkadzały komórki listerii, a do naprawy ich metabolizmu potrzebne były dłuższe czasy inkubacji we wzbogaconym bulionie. Knight (1998) sporządził spis wielu rodzajów powierzchni w zakładach przetwórstwa spożywczego, które wymagają szczególnej dezynfekcji, łącznie z wieloma powierzchniami ze stali nierdzewnej różnych urządzeń. Zanotował on, że szczególnie trudne do dezynfekowania są podłogowe kratki ściekowe i one prawdopodobnie są źródłem *Listeria monocytogenes* w zakładach mleczarskich. Jednakże jest możliwe, że ponowne pojawienie się *Listeria monocytogenes* w urządzeniach przetwórstwa spożywczego po dokładnej dezynfekcji jest spowodowane istnieniem biofilmów na różnych powierzchniach. Eliminacja przez dezynfektanty saprofitycznych organizmów antagonistycznych w stosunku do listerii daje w efekcie „rozkwit listerii”. Biofilmy są bardzo trudne do usunięcia. Zastosowanie środków dezynfekujących nie działających na biofilm powoduje, że listerie okresowo zanikają, po czym ponownie pojawiają się w środowisku produkcyjnym. Może to doprowadzić do błędnych wniosków co do skuteczności procesu dezynfekcyjnego.

1.3. Fizykochemiczne mechanizmy procesu adhezji drobnoustrojów

Pierwszym etapem zakażenia organizmu oraz środowisk przetwórstwa, surowców i produktów żywnościowych jest zjawisko adhezji drobnoustrojów do powierzchni. Własny schemat uwidoczniający znaczenie procesu adhezji w zasiedlaniu przez listerie różnych środowisk przedstawiono na ryc.2.



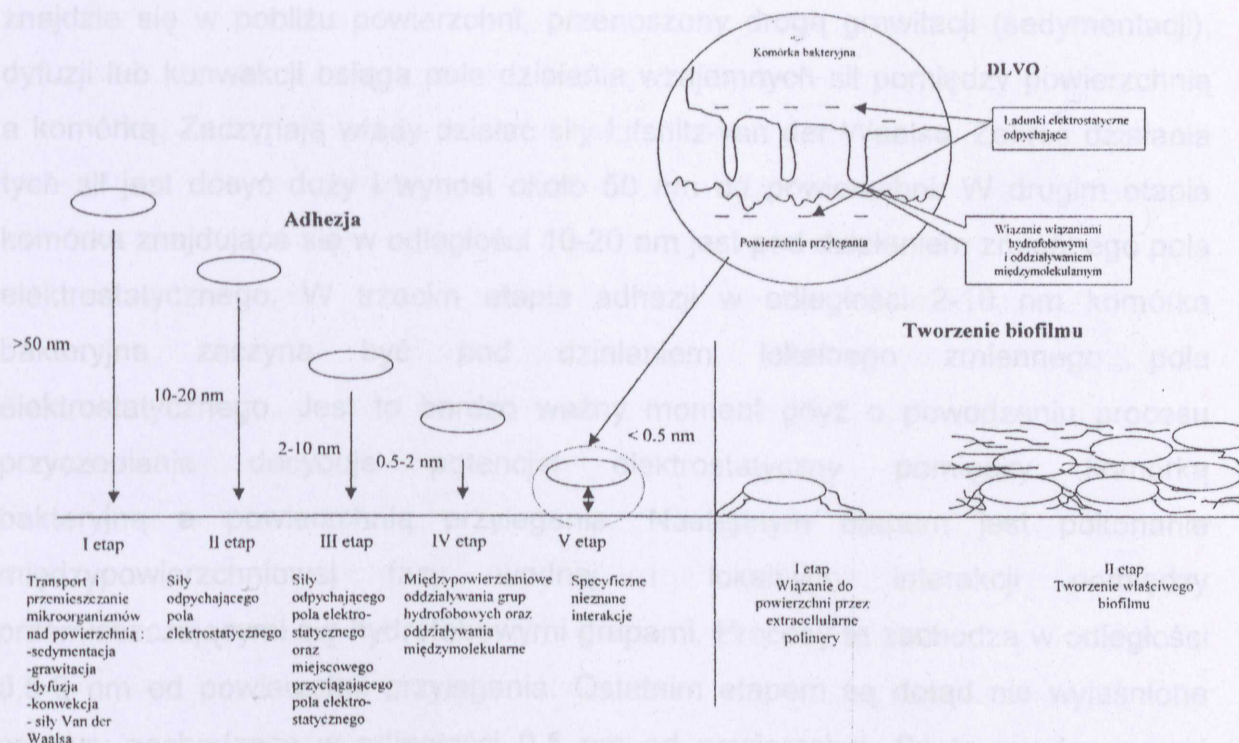
1. źródło (Chodorowska M. i wsp., 2002).
2. źródło (Mokracka J. i wsp., 2002)

Ryc.2. Rola adhezji listerii w procesie zakażenia.

Aby zaistniała adhezja konieczne jest spełnienie kilku podstawowych wymagań zarówno ze strony podłoża: rodzaj, odpowiednie właściwości strukturalne powierzchni - chropowatość powierzchni, odpowiedni skład chemiczny, właściwości hydrofobowe lub hydrofilowe powierzchni, oraz drobnoustroju: gatunek, struktura powierzchni bakterii, skład chemiczny ściany komórkowej, występowanie organelli ruchu.

Termin adhezja według Markiewicza jest używany do określenia względnie trwałego i nieodwracalnego związku między komórką bakteryjną, a daną

powierzchnią (Markiewicz, 1993). Badania nad tym procesem rozwinęły się w ostatnich latach, gdy zrozumiano znaczenie adhezji w pierwszych etapach zakażenia. Większość dobrze poznanych przykładów adhezji dotyczy interakcji między bakteriami a różnego typu komórkami zwierząt i ludzi. Zjawisko wiązania się bakterii do erytrocytów opisano już w 1908 roku. Adhezyny bakteryjne, które mają zdolność aglutynacji erytrocytów, noszą nazwę hemaglutynin. Najczęściej mają one charakter białkowy. Rzadziej są to wielocukry lub kwasy teichojowe. Większość dobrze scharakteryzowanych adhezyn to białka osłon, które w swych specyficznych interakcjach z receptorami przypominają reakcję przeciwciał z antygenami. Dużą grupę adhezyn stanowią fimbrie. Receptory rozpoznawane przez adhezyny to reszty węglowodanowe mniej lub bardziej złożonych glikoprotein lub glikolipidów. W swoistej adhezji następuje interakcja między wyspecjalizowanymi komplementarnymi cząsteczkami na powierzchni komórki bakteryjnej (adhezyny, zwane czasem lektynami) i powierzchni, do której następuje adhezja (receptory). Interakcja ta ma charakter wysoce swistego wiązania, które popularnie określane jest jako typ klucz-zamek. Dodatkowo według Kim przyleganie bakteryjne jest złożonym zjawiskiem zawierającym wiele różnych czynników. To czy dany drobnoustrój ulegnie adhezji zależy od jego struktury powierzchniowej i charakteru podłoża. Kiedy podłoże jest typowo biologiczne w grę wchodzi wiele innych złożonych czynników natury fizjologicznej (Kim i wsp., 1993). Według Markiewicza jeśli związek między komórką bakteryjną a określoną powierzchnią ma charakter odwracalny, mówimy o asocjacji, która może być wynikiem sił Van der Waalsa, wiązań wodorowych oraz interakcji jonowych i hydrofobowych (Markiewicz, 1993). Zarówno asocjacje jak i sama adhezja mogą prowadzić do kolonizacji powierzchni, co w przypadku błon biologicznych oraz tkanek może doprowadzić do kolejnej formy kolonizacji-inwazji. Mechanizm bakteryjnej adhezji jest procesem wieloetapowym. Rycina 3 przedstawia etapy adhezji według Doyle'a (1990) w modyfikacji własnej, uwzględniającej dalsze procesy powierzchniowe.



Ryc. 3. Schemat zasiedlania powierzchni przez drobnoustroje.

Pierwszy etap stanowi zagnieżdżenie drobnoustroju na powierzchni. Bakterie umiejscawiane i zatrzymywane są głównie przez siły fizyczne w nawet trudno dostępnych miejscach. To stadium jest odwracalne i ma związek z równowagą energii pomiędzy siłami Van der Waalsa i elektrostatycznym odpychaniem. Drugi etap, znacznie dłuższy opiera się na produkcji egzopolimeru przez bakterie; jest to etap nieodwracalny. Na tym etapie bakterie mnożą się tworząc mikrokolonie co prowadzi do powstania biofilmu (Kim i wsp., 1993).

Według Mafu, przyleganie bakteryjne uwarunkowane jest strukturą błony komórkowej, obecnością wypustek komórkowych, a także jej właściwościami powierzchniowymi, na które składają się parametry fizykochemiczne, takie jak elektrostatyczne interakcje, wiązania wodorowe, siły Van der Waalsa, potencjał elektrostatyczny oraz właściwości hydrofobowe (Mafu i wsp., 1990). Hydrofobowość drobnoustrojów jest wynikiem ogólnej budowy chemicznej ściany komórkowej bakterii. Jako ogólną zasadę przyjmuje się, że komórki hydrofilowe znacznie lepiej adherują do powierzchni hydrofilowych i podobnie komórki hydrofobowe lepiej adherują do powierzchni hydrofobowych (Van der Mei i wsp., 1993). Z kolei Doyle (1990) wyróżnia pięć etapów procesu adhezji. Twierdzi on, że gdy drobnoustrój

znajdzie się w pobliżu powierzchni, przenoszony drogą grawitacji (sedymentacji), dyfuzji lub konwekcji osiąga pole działania wzajemnych sił pomiędzy powierzchnią a komórką. Zaczynają wtedy działać siły Lifshitz-van der Waalsa. Zakres działania tych sił jest dosyć duży i wynosi około 50 nm od powierzchni. W drugim etapie komórka znajdująca się w odległości 10-20 nm jest pod działaniem zmiennego pola elektrostatycznego. W trzecim etapie adhezji w odległości 2-10 nm komórka bakteryjna zaczyna być pod działaniem lokalnego zmiennego pola elektrostatycznego. Jest to bardzo ważny moment gdyż o powodzeniu procesu przyczepiania decyduje potencjał elektrostatyczny pomiędzy komórką bakteryjną a powierzchnią przylegania. Następnym etapem jest pokonanie międzypowierzchniowej fazy wodnej i lokalnych interakcji pomiędzy przemieszczającymi się hydrofobowymi grupami. Procesy te zachodzą w odległości 0,5-2 nm od powierzchni przylegania. Ostatnim etapem są dotąd nie wyjaśnione procesy zachodzące w odległości 0,5 nm od powierzchni. Są to między innymi wiązania wodorowe, wiązania elektrostatyczne i wiązania Van der Waalsa. Różnią się one geometrią, siłą i specyficznością. Ponadto na wiązania te wpływa bardzo silnie choć w różny sposób, obecność cząsteczek wody.

Wiele prac poświęconych fizykochemicznym zjawiskom występującym podczas procesu adhezji wskazuje, że powierzchnia większości bakterii ma ładunek ujemny (Doyle i wsp., 1990, Markiewicz, 1993, Bouttier i wsp., 1997, Van Loosdrecht i wsp., 1987, Dikson i wsp., 1989). Inne powierzchnie typowo biologiczne, jak i stałe podłoża w środowisku wodnym mają zwykle także ładunek ujemny (Van Loosdrecht i wsp., 1987). Istnieją jednakże siły przyciągania, które działają by przewyciężyć siły odpychania między powierzchniami o podobnym ładunku. Siły przyciągania są dwojakiego rodzaju: działające, gdy dwie powierzchnie są stosunkowo daleko od siebie (10 lub więcej nm) i bardzo blisko (1 nm). Te dwie strefy przyciągania podzielone są obszarem, w którym następuje wzajemne odpychanie. Sposób, w jaki drobnoustroje pokonują obszar odpychania wyjaśnia teoria Derjaguina, Landau'a, Varvey'a, Overbecka (DLVO). Powierzchnie komórek nie są gładkie, lecz mają rozmaite struktury powierzchniowe. Struktury te mają niewielkie promienie krzywizny i jako takie wykazują znacznie mniejsze siły odpychania niż cała powierzchnia komórki. W miarę zmniejszania promienia krzywizny, siły odpychania zmniejszają się w znacznie większym stopniu niż siły przyciągania. W związku z tym wyrostki

(np. fimbrie) na powierzchni bakterii mogą przenikać przez strefę odpychania, doprowadzając do interakcji adhezyna-receptor (Markiewicz, 1993).

Powszechna opinia o elektryczności błon komórkowych jest ostatnio podważana. Na podstawie badań z użyciem bardzo wyrafinowanych technik mikroskopii elektronowej, sugeruje się, że pewne obszary błon mają ładunek dodatni. Ahmed i wsp. wykryli na komórkach nabłonkowych gardła ludzkiego mikro pofałdowania które mają ładunek dodatni o wartości 30.1 mV (Ahmed i wsp., 2000). Pofałdowania te mają odgrywać istotną rolę w procesach adhezji. Jednocześnie podważa to uniwersalność teorii DLVO.

Istotną rolę w ostatnim etapie procesu adhezji mogą spełniać wiązania wodorowe, które mogą również tworzyć się pomiędzy cząsteczkami nienaładowanymi, jak i naładowanymi. Energia tych wiązań waha się od 12,6 do 29,3 kJ/mol. Wiązania wodorowe są silniejsze od wiązań van der Waalsa, ale dużo słabsze od wiązań kowalencyjnych. Długość wiązania wodorowego zajmuje miejsce pośrednie pomiędzy długością wiązania kowalencyjnego i wiązania van der Waalsa. Ważną cechą wiązań wodorowych jest ich ściśle ukierunkowany charakter. Najsilniejsze wiązania wodorowe to te, w których donor, atom wodoru i akceptor leżą w jednej linii, czyli są kolinearne (Stryer, 1997).

Znaczny wpływ na wszelkie oddziaływania cząsteczkowe w układach biologicznych z uwagi na jej wszechobecność ma woda. Cząsteczka wody jest polarna. Ponadto charakteryzuje się dużym napięciem powierzchniowym. Woda w stanie ciekłym ma częściowo uporządkowaną strukturę, w której agregaty cząsteczek związanych wodorowo ulegają ciągłym procesom tworzenia się i rozrywania. Woda ma zdolność rozpuszczania cząstek polarnych osłabiając wiązania jonowe i wodorowe. Dzięki polarności i zdolności do tworzenia wiązań wodorowych woda wykazuje duże możliwości oddziaływań. Tego typu specyficzny układ ma miejsce w przypadku przyciągania hydrofobowego, ponieważ grupy niepolarne w wodzie mają tendencję do asocjacji (Stryer, 1997). Przyczyną tego są tzw. oddziaływania hydrofobowe. Obrazowo można powiedzieć, że woda wykazuje tendencję do wypychania cząstek niepolarnych poza swoje środowisko i zmusza je do łączenia się ze sobą. W wyniku zgrupowania cząstek heksanu w jednej niszy przestrzennej, kilka z uporządkowanych cząsteczek wody, otaczających uprzednio rozdzielone cząsteczki heksanu, zostaje uwolnionych. Zawieszona w wodzie cząsteczki niepolarne kierują się ku sobie, nie z powodu wzajemnego

powinowactwa, choć i ono odgrywa pewną rolę, ale raczej dlatego, że cząsteczki wody wiążą się silnie ze sobą (Stryer, 1997).

Kolejnym zjawiskiem zachodzącym w odległości 0,5 nm od powierzchni, które opisuje Absolom i wsp. (1983) oraz Busscher i wsp. (1984) jest problem adhezji bazujący na podstawach termodynamiki powierzchni. Podstawy te dotyczą zidentyfikowania potencjału termodynamodynamicznego oraz wolnej energii, które winny być w równowadze, czyli wolna energia adhezji na jednostkę powierzchni powinna wynosić:

$$\Delta F^{\text{adh}} = \gamma_{\text{BS}} - \gamma_{\text{BL}} - \gamma_{\text{SL}} < 0$$

gdzie:

- F^{adh} - wolna energia adhezji
- γ_{BS} - napięcie powierzchniowe między drobnoustrojem a powierzchnią przylegania
- γ_{BL} - napięcie powierzchniowe między drobnoustrojem a fazą ciekłą
- γ_{SL} - napięcie powierzchniowe między powierzchnią przylegania a fazą ciekłą.

Równanie to przedstawia równowagę wolnej energii. W ostatnich latach stało się możliwe otrzymanie danych eksperymentalnych z różnych napięć międzypowierzchniowych zawierających napięcia powierzchniowe pomiędzy podłożami stałymi.

Adhezja jest z energetycznego punktu najkorzystniejsza gdy:

$$\Delta F_{\text{adh}} > 0$$

Bardzo ważnym czynnikiem mogącym mieć istotny wpływ na ostatnie etapy procesu adhezji są wzajemne relacje pomiędzy właściwościami elektrostatycznymi samego drobnoustroju jak i powierzchni przylegania (Van Loosdrecht i wsp., 1987). Jak wspomniano wcześniej, wielu autorów poruszających problem elektrostatycznej teorii adhezji twierdzi, że wiele naturalnych powierzchni przylegania jest obdarzonych ładunkiem ujemnym, podobnie jak powierzchnia bakterii (Doyle i wsp., 1990, Markiewicz, 1993, Bouttier i wsp., 1997, Van Loosdrecht i wsp., 1987, Dikson i wsp., 1989). Ładunek ten może mieć różną wartość. Wzrost ładunku zależy od gatunku, warunków wzrostu, pH, i koncentracji różnych jonów nieorganicznych

(Doyle i wsp., 1990). W środowiskach wodnych, powierzchnie obdarzone ładunkiem są równoważone przez przeciwnie naładowane jony. Niektóre z nich są związane z powierzchnią przylegania, reszta rozmieszczona jest w warstwie dyfuzyjnej. Gęstość warstwy dyfuzyjnej zależy od siły jonowej roztworu i wartościowości jonów. Oddziaływania elektryczne pomiędzy cząsteczkami (włączając bakterie) w zawiesinie są kontrolowane przez wielkość warstwy dyfuzyjnej. Wzrost koncentracji soli powoduje spadek oddziaływań elektrycznych między powierzchniami o podobnych ładunkach (Van Loosdrecht i wsp., 1987). Doyle twierdzi, że istnieje odwrotna korelacja pomiędzy ładunkiem powierzchniowym a hydrofobowością bakterii. Jeżeli ładunek powierzchniowy wzrasta, spada hydrofobowość. Twierdzi też, że w przypadku blokowania wiązań kowalencyjnych lub dodatku kationów organicznych wzrasta hydrofobowość powierzchni bakterii (Doyle i wsp., 1990).

1.4. Hydrofobowość a adhezyjność i patogenność

Hydrofobowość mikroorganizmów jest ważną fizjologiczną cechą. Ułatwia ona bowiem adhezję drobnoustrojów do różnego rodzaju powierzchni oraz odgrywa rolę w procesie zakażenia komórek ludzkich czy zwierzęcych. Cecha ta ważna jest także dla niektórych patogenów roślin. Jak wiadomo powierzchnie wielu liści i owoców pokryte są warstwą wosków. Fitopatogenne grzyby pokonują tę przeszkodę wytwarzając, między innymi, białka hydrofobowe nazywane hydrofobinami o charakterze hydrofobowym, ułatwiające im adhezję do powierzchni roślin (Talbot i wsp., 1996).

Sugeruje się, że własność ta ma także znaczenie u chorobotwórczych pierwotniaków. Taką cechę stwierdzono u pierwotniaka *Entamoeba histolytica*. Stwierdzono, że szczepy wirulentne *Entamoeba* charakteryzują się wysoką hydrofobowością i tylko takie wywołują zmiany ropne w wątrobach sztucznie zakażonych chomików (Mukherjee i wsp., 1992).

Szczepy hydrofobowe przeżywają w wodzie morskiej dłużej niżeli hydrofilowe. Bakterie takie są także łatwiej pochłaniane przez morskie małże (Llanos i wsp., 2000). Tłumaczyłoby to wysoką koncentrację bakterii patogennych dla człowieka w tych organizmach, pomimo ich niskiej koncentracji w wodzie.

Flavobacterium psychrophilum- patogeny pstrągów tęczowych nabywają tą cechę w miarę przedłużania okresu przebywania w wodzie. Jednocześnie wzrasta ich zdolność do zakazania ikry ryb tego gatunku (Vatsos i wsp., 2001).

Hydrofobowość jest także ważna dla patogenności wirusów. Wirus krowianki wytwarza białka zbudowane z 53 aminokwasów, które będąc ulokowane w wirionie zwiększają zjadliwość tego wirusa (Betakova i wsp., 2000). Podobne białka stwierdzono u wirusów pneumonia (Randhawa i wsp., 1995).

Istotna jest także hydrofobowość spor bakteryjnych. Andersson i wsp. stwierdzili, że hydrofobowość spor *Bacillus cereus* jest ważnym elementem warunkującym ich adhezję do komórek nabłonkowych jelita. W następstwie tego następuje kiełkowanie spor i tworzenie się komórek wegetatywnych wraz z jednoczesnym wytwarzaniem enterotoksyny w miejscu adhezji (Andersson i wsp., 1998).

Większość analiz związków pomiędzy hydrofobowością a patogennością dotyczy własności komórek izolowanych z różnych środowisk. Badano czynniki odpowiedzialne za wirulencję koagulazo-ujemnych szczepów *Staphylococcus spp.* Przebadano 190 szczepów izolowanych z przypadków zapalenia wymienia u krów oraz 203 z różnych infekcji u ludzi. Stwierdzono, że 95% szczepów ludzkich i 82% bydłych było wysoce hydrofobowych przy czym szczepy te były patogene w testach wywoływania mastitis u samic królików z laktacją (Saa i wsp., 1995). Podobne wyniki uzyskali Ljung i wsp., którzy badali testem agregacji hydrofobowość szczepów *Staphylococcus aureus* wyizolowanych od chorych z posocznicą (Ljung i wsp., 1985). Stwierdzili w nich, że 90% szczepów silnie agregowało, co świadczy o ich wysokiej hydrofobowości. Podobną zależność stwierdzono w przypadku *Streptococcus pyogenes*. Szczepy izolowano od dzieci chorych na szkarlatynę i zapalenie migdałków oraz od zdrowych nosicieli. Potwierdzono statystyczną zależność pomiędzy hydrofobowością a pochodzeniem szczepów jak również zdolnością do adhezji do linii komórkowej Hep-6 (Dmitrieva i wsp., 1996). Prowadzono badania szczepów *Acinetobacter baumannii* izolowanych z dolnych dróg oddechowych, ran, krwi. Stwierdzono, że szczepy izolowane z dolnych dróg oddechowych oraz środowiska szpitalnego mają silniej wyrażoną cechę adhezji do kolagenu, fibronektyny i fibrynogenu oraz wyższą hydrofobowość (Loo i wsp., 1994). Statystyczna zależność istnieje także pomiędzy hydrofobowością a adhezyjnością do hydroksyapatytu pokrytego śliną szczepów *Actinomyces*

izolowanych z jamy ustnej (Koljsg i wsp., 1996). Znaczenie hydrofobowości dla zakaźności opisywane jest także w odniesieniu do szczepów *Pseudomonas aeruginosa* izolowanych od pacjentów z zakażeniami dróg moczowych (Jankowski i wsp., 1997), różnych gatunków *Pseudomonas* izolowanych z przypadków zapaleń płuc (Lobashevskii, 1992) oraz *Escherichia coli* wywołujących posocznice u kur (Erganis i wsp., 1989). W przypadku *Yersinia enterocolitica* zaobserwowano związek pomiędzy hydrofobowością a występowaniem plazmidów pYV warunkujących patogenność tych bakterii (Hazen i wsp., 1991, Paerregaard i wsp., 1991). Wykazuje się, że cecha ta ma również znaczenie dla patogenności *Candida albicans* przy czym wyróżnić można szczepy różniące się stopniem hydrofobowości (Lers i wsp., 1990). Podobne wyniki uzyskała Nagao (1999), badając wpływ hydrofobowości powierzchni, zawartości kwasu ślinowego i oddziaływania makrofagów na stopień wirulencyjności i awirulencyjności streptokoków. Na podstawie uzyskanych wyników, stwierdzono, że nasilenie działania badanych czynników objawia się zwiększeniem stopnia wirulencyjności dla obydwu badanych szczepów.

Istnieje jednak szereg prac wykazujących brak zależności pomiędzy zakaźnością a adherencyjnością do komórek i patogennością. Stwierdzono to w stosunku do *Staphylococcus epidermitis*, *haemoliticus* oraz *saprothiticus* (Molnar i wsp., 1994), *Staphylococcus aureus* (Iturralde i wsp., 1993), *Streptococcus pyogenes* (Leon i wsp., 1990) *Porphyromonas gingivalis* (Naito i wsp., 1993) *Campylobacter jejuni* (Field i wsp., 1993) a także takich gatunków jak *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, oraz *Candida albicans*.

Stwierdzone różnice w ocenie znaczenia hydrofobowości mogą mieć wiele przyczyn. Pierwszą i zasadniczą jest fakt, że hydrofobowość nie musi mieć znaczenia uniwersalnego dla życia wszystkich drobnoustrojów. Drugą przyczyną są warunki i metodyka badań. Hydrofobowość można bowiem badać z użyciem różnych metod i przez to uzyskiwać bardzo różne wyniki. Z kolei patogenność oceniać można in vitro i in vivo.

Burke i wsp. badali hydrofobowość szczepów *E.coli* izolowanych z przypadków wrzodziejącego zapalenia jelit oraz szczepów kontrolnych. Wykazali, że istnieje wysoka statystyczna zależność pomiędzy hydrofobowością a pochodzeniem szczepów. Jednocześnie nie stwierdzili takiej zależności w odniesieniu do adhezji badanych bakterii do komórek nabłonkowych policzka (Burke i wsp., 1988).

Dla ekspresji cechy hydrofobowości ważne są także warunki hodowli, w tym faza wzrostu oraz rodzaj pożywki (płynna czy stała). Wibawan i wsp. stwierdzili różnice w hydrofobowości u paciorkowców grupy B w zależności od pożywki oraz fazy wzrostu (Wibawan i wsp., 1993). Podobną zależność od fazy wzrostu stwierdził Glee i wsp dla *Candida albicans* (Glee i wsp., 2001). Autorzy ci jednocześnie zastosowali test adhezji do ludzkich komórek nabłonkowych aktywowanych interleukiną 1-beta. Stwierdzili, że aktywacja cytokinami komórek powodowała znacznie wyższą adhezję szczepów hydrofobowych w porównaniu do komórek nabłonkowych nieaktywowanych. Na hydrofobowość szczepów wpływają także ludzkie hormony. Uberos i wsp. stwierdzili, że hodowla *Neisseria meningitidis* z dodatkiem ludzkiego hormonu melatoniny znacznie podnosi hydrofobowość tych bakterii (Uberos i wsp., 2000).

Z kolei Jana (2000) w badaniach z *Pseudomonas fluorescens* wykazali, że wzrost zawartości takich jonów jak: Zn^{2+} , Fe^{3+} , K^+ i Mg^{2+} w podłożu powoduje wzrost hydrofobowości powierzchni komórki. Natomiast, takie enzymy jak: trypsyna, pepsyna, proteinaza K, powodują przekształcenie się badanych bakterii w hydrofilowe. Stwierdzono także że zdecydowanie częściej mikroorganizmy przylegają do powierzchni w środowisku bogatym w składniki odżywcze (Absolom i wsp., 1983).

O ile dane co do zależności pomiędzy patogennością i hydrofobowością są kontrowersyjne, to niewiele jest rozbieżności pomiędzy omawianą cechą a adhezyjnością. Na przykład hydrofobowość szczepów *Pseudomonas* jest cechą umożliwiającą tym drobnoustrojom adhezję do powierzchni soczewek kontaktowych (Bruinsma i wsp., 2001). Cecha ta ułatwia różnym szczepom szpitalnym zasiedlanie takich środowisk jak dreny, sączki, wenflony czy aparatura anestezyjologiczna.

Niewiele jak dotąd prac dotyczy hydrofobowości *Listeria monocytogenes* w zależności od warunków hodowli. Herald i Zottola (Herald, Zottola, 1988, Herald, Zottola, 1988) jako pierwsi badali przyleganie tych bakterii do powierzchni. Zaobserwowali, że drobnoustrój ten może adherować do materiałów używanych w procesie produkcyjnym takich jak: stal nierdzewna, propylen, guma. Mafu i wsp. stwierdzili, że powierzchnia *L. monocytogenes* jest hydrofilna (Mafu i wsp., 1990). Inni uznali, że jest względnie hydrofilna (Absolom i wsp., 1983). Dąbrowski donosi, że 74% szczepów *Listeria* spp. wyizolowanych z produktów mięsnych wykazało

właściwości hydrofilne po inkubacji w temperaturze 30°C. Zmniejszanie temperatury inkubacji do 20°C pociągnęło za sobą znaczny spadek ilości szczepów o właściwościach hydrofilnych. Szczepy inkubowane w 5°C utrzymały tę tendencję a nawet nieznacznie ją podnosząc (Dąbrowski i wsp., 2001). Przyczyną tego może być zmienność struktur powierzchniowych mikroorganizmów, a szczególnie składników błony zewnętrznej, która jest odpowiedzią na zmiany środowiska, w którym występują. Wiadomym jest bowiem, że warunki środowiskowe istotnie wpływają na proporcje i ilości izo i atenuzo, nieparzyście odgałęzionych kwasów tłuszczowych występujących w ścianie komórkowej *L. monocytogenes* (Annous i wsp., 1997). Także Smoot i Pierson (1998) w swych badaniach wykazali, że ekspozycja *L. monocytogenes* na krytyczne warunki środowiska (niska temperatura oraz obniżone pH) może efektywnie zmieniać właściwości powierzchniowe tego mikroorganizmu. Cecha hydrofobowości uważana jest za istotny czynnik przylegania, jednak w niektórych przypadkach nie można przewidzieć zdolności do przylegania na podstawie własności hydrofobowych, gdyż jak twierdzi Rosenberg zdolność do adhezji zależy również od takich czynników jak skład podłoża hodowli czy fazy wzrostu (Rosenberg, 1984). Mafu zaobserwował, że *L. monocytogenes* hodowana w 37°C jest hydrofilowa (Mafu i wsp., 1991) przy czym istnieje zależność pomiędzy hydrofobowością a pH środowiska bowiem hydrofobowość tych bakterii wzrasta jeżeli pH maleje. Tezę o wpływie białek na adhezję patogennego szczepu ScottA *L. monocytogenes* próbuje dowieść Al –Makhlafi i wsp., który badał wpływ białek mleka na adhezję listerii do hydrofilowych i hydrofobowych powierzchni silikonowych. Stwierdza, że pokrycie powierzchni beta-laktoglobuliną, zwiększa stopień adhezyjności listerii. Natomiast pokrycie tych powierzchni albuminą wołową ma przeciwny efekt (Al –Makhlafi i wsp., 1994). Na hydrofobowość listerii ma także wpływ obecność nizyny w środowisku. Z takim zjawiskiem listerie spotykają się w żywności w której obecne są bakterie kwasomlekowe. W obecności tego antybiotyku dochodzi do wzrostu hydrofobowości nizyno-opornych szczepów *L. monocytogenes* (Maisnier-Patin i wsp., 1996). Braindet donosi o wpływie temperatury inkubacji oraz składu podłoża na ładunek powierzchniowy oraz hydrofobowość szczepu ScottA *Listeria monocytogenes* (Braindet i wsp.1999). Wykazując, że hydrofobowość zależy od temperatury oraz składu podłoża oraz sugerując na podstawie badań Anderssona (1998) nad sporami *Bacillus cereus*, że patogenność listerii zależy od stopnia nasilenia tych cech.

W piśmiennictwie mało jest prac wskazujących na powiązania pomiędzy hydrofobowością i patogennością *L. monocytogenes*, ponieważ większość autorów skupia się nad znajdowaniem różnic pomiędzy szczepami pochodzącymi z żywności i wyizolowanymi z przypadków chorobowych. Conte (1996) badał adhezyjność i inwazyjność listerii do linii komórek Caco-2. Stwierdził, że obecność żelaza w podłożu ma istotny wpływ na te cechy listerii. Jednocześnie obecność żelaza powodowała, że komórki były wysoce hydrofobowe. Żelazo miało także wpływ na profil białek powierzchniowych tych bakterii. Autor stwierdza, że żelazo wpływa na procesy transkrypcji genów *ilnAB* i *hly*. Taylor sugeruje że transkrypcja genu *relA* i produkcja guanozynopentafosforanu (p)ppGpp po adhezji może mieć wpływ na własności patogene listerii (Taylor i wsp., 2002).

W podsumowaniu niniejszego rozdziału można stwierdzić, że problematyka wpływu zmienności środowiska na drobnoustroje, między innymi w aspekcie ich zachowań w środowiskach przetwórstwa jak i w samej żywności, jest bardzo ważnym zagadnieniem. Ponieważ *Listeria monocytogenes* należy do najważniejszych patogenów występujących w żywności uzasadnionym jest prowadzenie badań także z tym drobnoustrojem, tym bardziej, że jak wspomniano wcześniej należy on do wyjątkowo fizjologicznie plastycznych bakterii. Celowym jest zatem bardziej kompleksowe określenie wpływu zmian środowiskowych, między innymi na hydrofobowość tych drobnoustrojów. Cecha ta ma znaczenie w zanieczyszczaniu żywności jak i patogenności niektórych mikroorganizmów. Jak wiadomo osłonki kielbas są niezbędnym składnikiem używanym w przetwórstwie mięsa, ważnym jest zatem zarówno dla celów teoretycznych, jak i praktycznych, określenie wpływu zmian środowiskowych na adhezyjność listerii do różnego rodzaju osłonek. Istotnym jest także analiza tegoż wpływu na patogenność tych drobnoustrojów. Może to bowiem pozwolić na podjęcie działań zmniejszających stopień zanieczyszczenia, jak i przyczynić się do zmniejszenia zagrożenia tym drobnoustrojem.

2. CEL PRACY

Własności struktur powierzchniowych drobnoustrojów a w tym hydrofobowość warunkują ich zdolność do adhezji do powierzchni produkcyjnych, surowców, produktów oraz tkanek organizmów żywych. Jednocześnie cechy powierzchniowe bakterii ulegają zmianom pod wpływem warunków środowiskowych. Dane dotyczące tego zagadnienia w odniesieniu do *Listeria monocytogenes* są bardzo niekompletne, stąd w niniejszej pracy postanowiono określić:

1. wpływ warunków środowiskowych na hydrofobowość szczepów *Listeria monocytogenes*,
2. zbadanie wpływu warunków hodowli na adherencyjność *Listeria monocytogenes* do różnych osłonek kiełbas,
3. patogenność dla myszy grup *Listeria monocytogenes* o różnym stopniu hydrofobowości.

Z prac wykonanych wcześniej w Katedrze Mikrobiologii Żywności Akademii Rolniczej w Szczecinie wynikało, że pogarszanie warunków hodowli *L. monocytogenes* (niska temperatura) zwiększa ich hydrofobowość. Ponadto z danych z piśmiennictwa wynikało, że niektóre rodzaje bakterii hydrofobowych są bardziej patogenne.

W związku z powyższym postawiono następującą hipotezę.

Ponieważ listerie w warunkach przechowywania żywności stykają się z niskimi temperaturami, obniżonym pH, zwiększoną koncentracją NaCl oraz warunkami beztlenowymi założono, że będą się one stawały hydrofobowe. Wystąpienie tej cechy będzie ułatwiało im zasiedlanie "hydrofobowych" środowisk produkcji mięsnej żywności (środowisko tłuszczowe). Mogłoby to tłumaczyć tak częste występowanie tych drobnoustrojów w produktach mięsnych i rybnych. Ponadto cecha hydrofobowości będzie zwiększała ich patogenność poprzez ochronne działanie przed kwasem solnym żołądka, dzięki pomocy micelli tłuszczowych powstających w trakcie przeżuwania tłustych pokarmów. Występujące w takich micellach listerie będą mniej narażone na działanie kwasu solnego. Forma hydrofobowa omawianych

bakterii będzie bardziej patogenna poprzez ułatwioną adhezję do komórek nabłonka jelitowego. Doświadczalne potwierdzenie postawionej hipotezy pozwoliłoby na wyjaśnienie przyczyn wzrostu zachorowań na listeriozę w ostatnich dwóch dekadach.

Do badań użyto szczepów *Listeria monocytogenes* przedstawione w Tabeli 2 wyizolowane z żywności oraz szczepów wzorcowy z kolekcji amerykańskiej ATCC (American Tissue Culture Collection).

Tabela 2. Szczepów *Listeria monocytogenes* i ich pochodzenia (NCTM)

Numer szczepu	Źródło	Charakterystyka	Serotyp
1-IV	Wędliny	Wzrost wolny	1/2a
2-VI	Wędliny	Wzrost wolny	1/2a
16	Wędliny	Wzrost wolny	1/2a
19	Wędliny	Wzrost wolny	1/2a
61	Wędliny	Wzrost wolny	1/2a
24-X	Wędliny	Wzrost wolny	1/2a
3-VII	Wędliny	Wzrost wolny	1/2a
4-XI	Wędliny	Wzrost wolny	1/2a
5-X	Wędliny	Wzrost wolny	1/2a
3-V	Wędliny	Wzrost wolny	1/2a
LM-1877	Wędliny	Wzrost wolny	4

3.2. Izolacje szczepów *Listeria monocytogenes* z żywności

25 g próbki żywności miały być homogenizowane w rozkładniku po rozdrożeniu 1:10 w 225 ml Fraser Duffa Neutralizujący płyn (N) i inkubowane przez 24 godziny w 30°C. Po inkubacji materiał pomieszczone na czułą selektywną Agar (Oxoid formulation) (Oxoid). Pojemna była inkubowana przez 48 godzin w temperaturze 50°C. Podejrzane kolonie porównano do Listeria Selective Agar. Po 48 godzinach inkubacji materiał przesłano do DHI (Oxoid) z następnym okresem inkubacji 48 godzin. Kolonie *Listeria monocytogenes* i jej krewnych z wyjątkiem *Listeria innocua* i *Listeria seeligeri* rozróżniano na agarze na anacyklicum oraz wykonywano test na katalazę i oksydazę. Rozpoznanie

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Szczepy *Listeria monocytogenes* użyte do badań

Do badań użyto szczepy *Listeria monocytogenes* przedstawione w Tabeli 2 wyizolowane z żywności oraz szczep wzorcowy z kolekcji amerykańskiej ATCC (American Tissue Culture Collection).

Tabela. 2. Szczepy poddane ocenie hydrofobowości metodą MATH

Numer szczepu	Identyfikacja	Pochodzenie	Serotyp
1-IV	<i>L. monocytogenes</i>	mięso wieprzowe	1/2a
2-XVI	<i>L. monocytogenes</i>	mięso wieprzowe	1/2a
15	<i>L. monocytogenes</i>	mięso wieprzowe	1/2a
19	<i>L. monocytogenes</i>	mięso wieprzowe	1/2a
61	<i>L. monocytogenes</i>	mięso wieprzowe	1/2a
34-X	<i>L. monocytogenes</i>	mięso wołowe	1/2a
3-VII	<i>L. monocytogenes</i>	mięso wołowe	1/2a
4-XI	<i>L. monocytogenes</i>	mięso wołowe	1/2a
4-IX	<i>L. monocytogenes</i>	mięso wołowe	1/2a
3-V	<i>L. monocytogenes</i>	mięso wołowe	1/2a
LM-1577	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114		4a

3.2. Izolacja szczepów *Listeria monocytogenes* z żywności

25 g próbki żywności było homogenizowane w stomacherze po rozcieńczeniu 1:10 w 225 ml Fraser Broth. Następnie próbki były inkubowane przez 24 godziny w 30°C. Po inkubacji materiał przesiewano na *Listeria Selective Agar* (Oxford formulation) (Oxoid). Posiane płytki inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 30°C. Podejrzane kolonie ponownie przesiewano na *Listeria Selective Agar*. Po 48 godzinach inkubacji materiał przesiewano na BHI (Oxoid), a następnie określano morfologię drobnoustrojów w preparatach barwionych metodą Grama, aktywność hemolityczną na agarze z dodatkiem 5% krwi ludzkiej, ruchliwość na agarze półpłynnym oraz wykonywano test na katalazę i oksydazę. Potwierdzenie

identyfikacji szczepów wykonywano z zastosowaniem testów API oraz metodą PCR. Ponadto, badano serotypy wyizolowanych szczepów przy użyciu surowic (Difco).

3.2.1. Metoda API

Identyfikacji biochemicznej szczepów z rodzaju *Listeria* dokonano według testów API[®]-*Listeria* (bioMerieux). Do 2 ml Suspension Medium (woda demineralizowana) dodano badane kolonie. Gęstość zawiesiny określano w densytometrze (bioMerieux), doprowadzając ją do 0,5 według skali Mc Farlanda, co odpowiada 1×10^7 bakterii w ml. Otrzymaną zawiesiną przy pomocy pipety, wypełniano studzienki w zestawach API[®]-*Listeria*. Wyniki odczytywano po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 37⁰C. Bezpośrednio przed odczytem do studzienki DIM dodano odczynnik ZYM B (błękit Fast Blue rozpuszczony w 2-metoksy-etanolu). Uzyskane wyniki opracowywano dalej przy pomocy programu ATB Expression (bioMerieux).

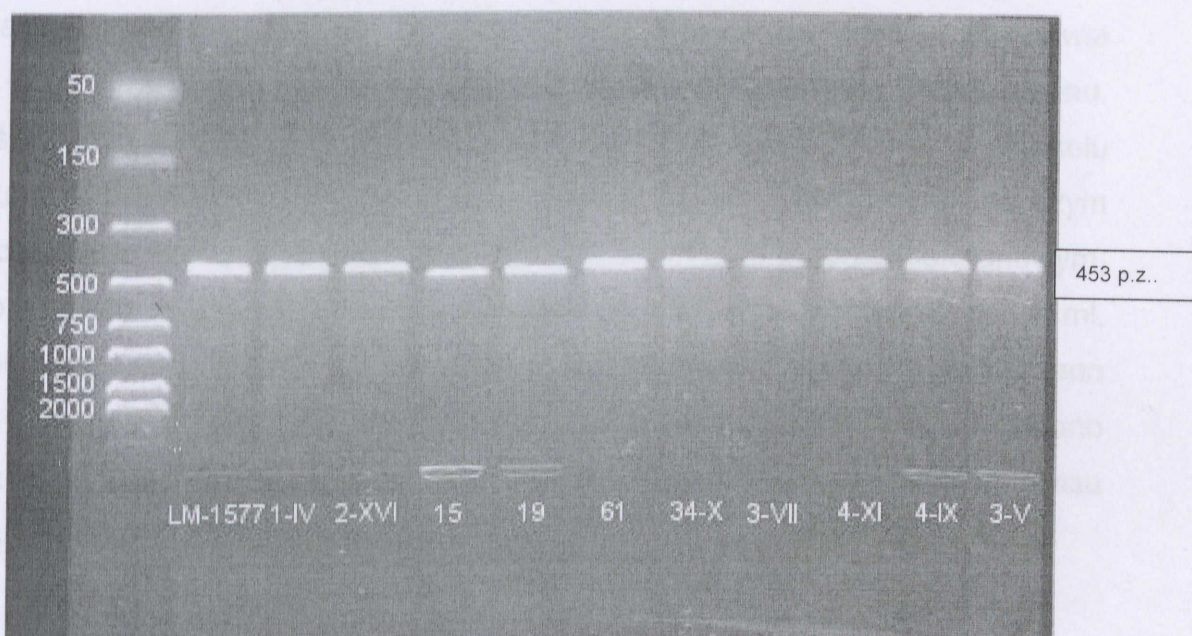
3.2.2. Metoda PCR

W celu potwierdzenia wyników identyfikacji biochemicznej stosowano reakcję łańcuchową (polymerase chain reaction, PCR) polimerazy, która umożliwia powielenie odpowiedniego fragmentu DNA w ilości wystarczającej do bezpośredniej obserwacji i oceny podczas rozdzielów elektroforetycznych. Do testu używano starterów o sekwencji: Mar1 (sense) 5'-GGG CTT TAT CCA TAA AAT A-3' i Mar2 (antisense) 5'-TTG GAA GAA CCT TGA TTA-3' (TIB MOLBIOL, Polska). Prowadzona identyfikacja składała się z trzech etapów:

1. Izolacja DNA z zawiesiny kultur bakterii przy zastosowaniu zestawów QIAamp DNA Mini (Qiagen, Niemcy) z wykorzystaniem proteiny K.
2. Reakcji łańcuchowej polimerazy składającej się z:
 - a) wstępnej denaturacji (5 minut w temperaturze 96⁰C),
 - b) 35 cykli reakcji, z których każdy obejmował:
 - termiczną denaturację powielonego DNA (30 sekund w temperaturze 94⁰C)
 - asocjację oligonukleotydów (starterów) z matrycą (30 sekund w temperaturze 63⁰C)

- syntezę DNA (45 sekund w temperaturze 72⁰C)
 - c) końcowe wydłużanie (7 minut w temperaturze 72⁰C)
 - d) obniżenie temperatury do 4⁰C.
- Reakcje prowadzono w termocyklerze Mastercycler Gradient (Eppendorf)
- 3. elektroforezy (rozdziął produktów reakcji PCR w żelu agarozowym w polu elektrycznym o napięciu 130V)

Obserwację produktów prowadzono na transiluminatorze w promieniach ultrafioletowych o długości 260 nm stosując program GelDoc (BioRad, USA). Uzyskane wyniki (ryc. 37) identyfikowano porównując je z odpowiednim markerem masowym.



Ryc.37.Identyfikacja szczepów *L. monocytogenes* techniką PCR (2% żel agarozowy, PCR marker 50-2000 pz (Merck)).

3.2.3. Identyfikacja serologiczna szczepów *Listeria monocytogenes*

Szczepy użyte do badań serotypowano surowicami Difco: wieloważną oraz 1, (odpowiednik serotypu 1/2a) i 4, (odpowiednik serotypu 4b). Dziesięć szczepów *L. monocytogenes* wyizolowanych z żywności miało serotyp 1/2a, natomiast szczep wzorcowy, kliniczny serotyp 4a.

Po identyfikacji szczepy przesiewano na bulion BHI z dodatkiem 15% glicerolu i przechowywano w zamrożeniu w temp -20⁰ C.

3.3. Wyznaczanie krzywej logarytmicznego wzrostu *Listeria monocytogenes*

Szczep wzorcowy LM-1577 hodowano na podłożu płynnym BHI (Oxoid) w temperaturze 30°C. Przyrost ilości komórek określano w czasie 0-168 godzin: w początkowej fazie co 1-3 godziny a następnie co 6 godzin, metodą płytkową z wykorzystaniem kolejnych rozcieńczeń dziesiętnych.

3.4. Ocena hydrofobowości szczepów *Listeria monocytogenes*

Hydrofobowość szczepów oceniano metodą MATH (microbial adhesion to hydrocarbons) podaną przez Van der Mei (Van der Mei i wsp., 1993) na podstawie oceny stopnia adhezji bakterii do rozpuszczalnika niepolarnego heksadekanu. W części badań zamiast heksadekanu stosowano olej z oliwek (Fluka). W tym celu po inkubacji, bakterie zmywano z podłoża roztworem soli fizjologicznej, po czym sporządzano zawiesinę o gęstości około 10^8 JTK/ml w 0,1 M buforze fosforanowym, co odpowiadało ekstynkcji 0,4 przy długości fali 600 nm. Następnie do 4 ml zawiesiny dodawano 1,5 ml heksadekanu lub oleju z oliwek i zawiesinę wytrząsano przez 10 sekund, a następnie pozostawiono na 10 minut. Po tym czasie mierzono ekstynkcję fazy buforowej. Procedura ta była powtarzana do całkowitego czasu wytrząsania 60 sekund. Uzyskane wyniki przeliczano według poniższego wzoru.

$$(A_t/A_0) \times 100\%$$

gdzie:

- A_0 – początkowa ekstynkcja zawiesiny,
- A_t – ekstynkcja zawiesiny po określonym czasie wytrząsania mierzona względem próby zerowej (czysty bufor fosforanowy)

Szczep uznawano za hydrofilowy, gdy po 60 sekundowym wytrząsaniu spadek gęstości optycznej zawiesiny wynosił mniej niż 30%. W przypadku gdy spadek gęstości mieścił się w zakresie od 30 do 70%, szczep określano jako średnio hydrofobowy. Gdy spadek wynosił więcej niż 70% szczep uznawano jako silnie hydrofobowy.

3.5. Wpływ warunków hodowli na hydrofobowość *L. monocytogenes*

Przed badaniem szczep rozmrażano i przesiewano na (LSA) celem sprawdzenia czystości a następnie na podłoże namnażające BHI agar (Oxoid) na którym inkubację prowadzono w temperaturze 30°C przez 24 godziny

a. wpływ temperatury hodowli

Szczepy inkubowano:

- 24 godziny w temperaturze 30°C na podłożu BHI agar (Oxoid),
- 45 dni w temperaturze 4°C na podłożu BHI agar (Oxoid).

b. wpływ składu podłoża

Poszczególne szczepy hodowano na trzech rodzajach podłoży:

- podłożu BHI agar (Oxoid) przez 48 godzin w temperaturze 30°C,
- agarze cukrowym (agar (Difco) + 1% glukozy) przez 48 godzin w temperaturze 30°C,
- agarze zwykłym (Difco) przez 48 godzin w temperaturze 30°C.

c. wpływ pH podłoża

Obniżenie odczynu podłoża BHI agar (Oxoid) do pH 5,5 dokonywano za pomocą kwasów: solnego, octowego i mlekowego. Hodowle na tak przygotowanych podłożach prowadzono w 30°C przez 24 godziny.

d. wpływ NaCl

Hodowlę prowadzono na podłożu BHI agar (Oxoid) z dodatkiem 8% NaCl w temperaturze 30°C przez 24 godziny.

e. wpływ warunków beztlenowych

Szczepy były hodowane na podłożu BHI agar (Oxoid) w temperaturze 30°C przez 24 godziny i 45 dni w temperaturze 4°C. Warunki beztlenowe uzyskiwano przy pomocy pompy próżniowej (Zepter) uzyskując -0,8 MPa.

f. adhezyjność *Listeria monocytogenes* do oleju roślinnego

Szczepy hodowano na podłożu BHI agar (Oxoid) w temperaturze 30°C i 4°C. W analizie zmieniono czynnik hydrofobowy zastępując heksadekan olejem z oliwek (Fluka).

3.6. Ocena adhezji szczepów *Listeria monocytogenes* do osłonek kielbas

Przedmiotem tej części badań były osłonki standardowo wykorzystywane w przemyśle mięsnym. Do analiz użyto czterech typów osłonek udostępnionych przez szczecińskie firmy:

- Zakłady Mięsne „Agryf”
- Spółkę „Drobimex-Heintz”
- Spółkę „MasAr”

Tabela 3. Typy osłonek użyte do badań

Typ osłonki	Producent
Jelita naturalne	Szczecińskie Zakłady Mięsne Agryf
O słonki kolagenowe COLFAN bezbarwne	Viscofan S.A., Pamplona, Hiszpania
O słonki celulozowe VISCOFAN Light Smoke	Viscofan S.A., Pamplona, Hiszpania
O słonki poliamidowe VISCOFAN Light Smoke	Viscofan S.A., Pamplona, Hiszpania

3.6.1. Wpływ temperatury hodowli i temperatury procesu adhezji

Badano adhezję komórek *Listeria monocytogenes* do osłonek kolagenowych i celulozowych. Analizie poddano dwa szczepy hydrofobowe (1-IV, LM-1577) i dwa hydrofilowe (4-XI, 3-V), uzyskane w wyniku hodowli w 30°C i 4°C.

Przed testem osłonki były cięte aseptycznie na kwadraty o powierzchni 4cm² i zanurzane w jałowej soli fizjologicznej na 24 godziny. Proces adhezji prowadzono przez 15 minut w wodnej, zbuforowanej zawieszynie drobnoustrojów w temperaturach 5°C i 30°C stosując zawiesiny o gęstościach 3x10⁵, 3x10⁶, 3x10⁷, 3x10⁸ kom/ml. Po tym czasie próbki czterokrotnie płukano przez energiczne wytrząsanie w 50cm³ jałowej soli fizjologicznej. Po odcieknięciu, próbki przenoszono na płytki z podłożem LSA i inkubowano 24 godziny w 30°C. Kolonie zliczano z powierzchni 1 cm².

3.6.2. Wpływ warunków beztlenowych

Badano adhezję do osłonek naturalnych (jelita, kolagen) oraz sztucznych (celuloza, poliamid) szczepów *Listeria monocytogenes* LM-1577 i 1-IV hodowanych w warunkach tlenowych i beztlenowych na podłożu BHI agar (Oxoid) w temperaturze 30°C. Warunki beztlenowe uzyskiwano przy pomocy pompy próżniowej (Zepter) uzyskując -0,8 MPa.

Przed testem osłonki były cięte aseptycznie na kwadraty o powierzchni 4 cm² i zanurzane w soli fizjologicznej jałowej na 24 godziny. Proces adhezji prowadzono przez 15 minut w wodnej, zbuforowanej zawieszynie drobnoustrojów w temperaturze 30°C stosując zawiesiny o gęstościach 3x10³, 3x10⁴, 3x10⁵, 3x10⁶ kom/ml. Po tym czasie próbki czterokrotnie płukano przez energiczne wytrząsanie w 50 cm³ jałowej soli fizjologicznej. Po odcieknięciu próbki przenoszono na płytki z podłożem LSA i inkubowano 24 godziny w 30°C. Kolonie zliczano z powierzchni 1 cm².

3.6.3. Ocena adhezji szczepów *Listeria monocytogenes* do osłonek kiełbas powleczonych filmem tłuszczowym

a. Powlekanie osłonek filmem tłuszczowym

Bezpośrednio przed procedurą adhezji, osłonki powlekano filmem tłuszczowym. Wykorzystywano tłuszcze ciekłe i stałe. Szczegółowe dane dotyczące poszczególnych rodzajów tłuszczy przedstawiono w Tabeli 4. Osłonki były powlekane filmem w zależności od zastosowanego tłuszczu; w przypadku tłuszczu stałego po uprzednim stopieniu w temperaturze 60°C, w przypadku olejów płynnych na zimno. Czas powlekania ustalono na 10 minut. Po opłaszczaniu próbki, nadmiarowi substancji opłaszczającej pozwolono swobodnie ocieć w temperaturze 20°C przy zachowaniu warunków jałowości (wysterylizowana promieniami UV komora do posiewów).

Tabela.4. Dane dotyczące tłuszczów użytych do badań.

Użyty tłuszcz	Rodzaj filmu tłuszczowego
Tłuszcz stały- smalec-(Szczecińskie Zakłady Mięsne Agryf)	Film stały
Olive oil – low acidity- (Fluka)	Film płynny
Olive oil – mixture of oleic acid, linoleic acid and linolenic acid – (Fluka)	Film płynny

b. Ocena adhezji szczepów *Listeria monocytogenes* do osłonek kiełbas powleczonych filmem tłuszczowym

Po odcieknięciu osłonek z tłuszczu przenoszono je do zawiesin *Listeria monocytogenes*, analogicznie jak w punkcie 3.6.2., a następnie inkubowano na podłożu LSA przez 24 godziny w 30°C. Następnie liczone wyrosłe kolonie z 1 cm² powierzchni przylegającej do podłoża (zaczernienie) jak i części wierzchniej osłonki (zliczanie JTK za pomocą lupy z odpowiednim kątem padania światła). Przenosząc dane na wykres przyjmowano 300 JTK jako 100% (granice zliczalności płytki).

3.7. Oznaczenie ilości *Listeria monocytogenes* w śledzionach i wątrobach myszy

Otrzymywanie określonych form szczepów *Listeria monocytogenes*

Przed podaniem myszom szczepy *Listeria monocytogenes* hodowane były w taki sposób, aby otrzymać formy hydrofobowe i hydrofilowe.

Jako formę hydrofilową użyto szczep 2-XVI. Aby uzyskać tę cechę, szczep hodowano w warunkach próżniowych, na podłożu BHI (Oxoid) przez 24 godziny w 30°C.

Jako formy hydrofobowej użyto szczep 1-IV. Aby potwierdzić własności hydrofobowe szczepu, prowadzono hodowlę przez 14 dni na podłożu BHI (Oxoid) w temperaturze 4°C.

Bezpośrednio przed podaniem oznaczono hydrofobowość badanych szczepów metodą MATH.

Badania prowadzono zgodnie z zezwoleniem na prowadzenie doświadczeń na zwierzętach nr 12/02 z dnia 12.03.2002 roku. na podstawie wniosku nr 7/02 z dnia 31.01.2002r.

Myszy inbred samce, rasy BALB/cJ/Han/IMP, pokolenie F_{42/2} o wadze ok. 26 - 29g (± 5g) sprowadzono z Instytutu Medycyny Pracy im. Prof. J. Nofera w Łodzi. Po przewiezieniu do pomieszczeń zwierzętarni Katedry Mikrobiologii i Immunologii Pomorskiej Akademii Medycznej zwierzęta umieszczano po 10 szt. w klatkach na podkładzie z trocin. Z uwagi na stres manipulacyjny związany z transportem, przyjęto czternastodniowy okres adaptacji przed rozpoczęciem badań. Przez ten okres miały one stały dostęp do wody oraz paszy Muligran. Dobę przed doświadczeniem zwierzęta zostały pozbawione dostępu do paszy.

Doświadczenia prowadzono w oparciu o metodykę podaną przez Barbour (1996): 10⁸ komórek listerii zawieszonych w 0.2 ml soli fizjologicznej lub emulsji olejowo-wodnej podawano grupie 5 zwierząt *per os* za pomocą specjalnie przygotowanej sondy. Bezpośrednio przed podaniem sporządzano emulsję olejowo-wodną bakterii w soli fizjologicznej zmieszanej w stosunku 1:1 z olejem z oliwek (Fluka). Emulsję wstępnie worteksowano i kilkunastokrotnie, energicznie

przeciągano przez strzykawkę z igłą o średnicy 0.2 mm. Po podaniu zawiesin, zwierzęta przetrzymywane były przez okres 72 godzin, będąc karmione jak przed doświadczeniem. Następnie zwierzęta uśmiercano przez dyslokację kręgów szyjnych i sekcjonowano. Po otwarciu jamy brzusznej pobrano wątroby, śledziony i wycinki jelit. Pobrane organy były ważone i pakowane do sterylnych woreczków z tworzywa sztucznego.

Poszczególne organy homogenizowano w 10 ml płynu do rozcieńczeń (jałowa sól fizjologiczna) używając Colworth Stomacher 400 (Seward Medical, Wielka Brytania). Następnie sporządzano szereg rozcieńczeń dziesiętnych, z których dokonywano posiewu na podłoże LSA (Oxoid). Płytki inkubowano 48 godzin w 30°C.

Po okresie inkubacji zliczano wyrosłe kolonie *Listeria monocytogenes* na urządzeniu do liczenia kolonii (new brunswick scientific).

3.8. Obliczenia statystyczne

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono z wykorzystaniem programu *STATISTICA 6.0 PL*:

- Istotność różnic badana była testem Scheffego przy poziomie istotności $p=0,05$.
- Analizę skupień wykonano metodą pełnego wiązania odległościami euklidesowymi.

4.2. Wpływ warunków hodowli na rozmnożenie *Listeria monocytogenes*

4.2.1. Czas hodowli

Badania prowadzono na podłożu płynnym Bif (Oxoid). Płytki do badań pobierano po 6, 12, 24, 48 i 72 godzinach. Wyniki zmian optyczności zawiesin hodowanych szczepów oraz uśredniamy grupujący szczepy z danego dnia. Wyniki przedstawiono na rys. 5 oraz zbiorczy wykres na rys. 6.

4. WYNIKI

Badania wpływu warunków środowiskowych na własności *Listeria monocytogenes* składały się z czterech etapów:

1. Wyznaczenie krzywej logarytmicznego wzrostu *Listeria monocytogenes* szczepu wzorcowego LM-1577,
2. Oznaczenie wpływu warunków hodowli na hydrofobowość *Listeria monocytogenes*,
3. Badanie wpływu warunków środowiskowych na adhezję szczepów *Listeria monocytogenes* do osłonek kiełbasianych,
4. Oznaczenia zakaźności szczepów hydrofobowych i hydrofilowych *Listeria monocytogenes* dla myszy.

4.1. Krzywa logarytmicznego wzrostu *Listeria monocytogenes*

W pierwszym etapie badań wyznaczano krzywą logarytmicznego wzrostu szczepu wzorcowego LM-1527. W tym celu drobnoustroje hodowano na podłożu płynnym BHI (Oxoid) w temperaturze 30°C przez 168 godzin. Próby pobierano początkowo co 3 godziny następnie, co 6 godzin, zaś po pierwszej dobie hodowli co 24 godziny. Otrzymane wyniki przedstawiono w formie wykresu na ryc. 4. Utworzyły one klasyczną krzywą logarytmicznego wzrostu drobnoustrojów. Stwierdzono obecność fazy adaptacyjnej (lag faza), która trwała od 1 do 3 godziny hodowli. Następnie pomiędzy 3 a 24 godziną wystąpił okres logarytmicznego wzrostu. Pomiedzy 24 a 72 godziną zaobserwować można fazę zwolnionego zamierania oraz po 72 godzinie fazę logarytmicznego zamierania (ryc.4).

4.2. Wpływ warunków hodowli na hydrofobowość *Listeria monocytogenes*

4.2.1. Czas hodowli

Badania prowadzono na podłożu płynnym BHI (Oxoid). Próbkę do badań pobierano po 6, 12, 24, 48 i 72 godzinach. Wyniki zmian hydrofobowości dziewięciu badanych szczepów oraz dendrogram grupujący szczepy o określonych własnościach przedstawiono na ryc. 5 zaś zbiorczy wykres na ryc. 4. Stwierdzono,

że w trakcie pierwszych 6 godzin hodowli listerie przekształcają się gwałtownie z hydrofilowych w hydrofobowe. Następnie w trakcie fazy intensywnego logarytmicznego rozwoju dochodzi do wzrostu hydrofobowości, która ponownie zaczyna gwałtownie spadać po 16 godzinach hodowli. Spadek ten trwa do 24 godziny hodowli po którym można zaobserwować ponownie łagodny wzrost hydrofobowości.

4.2.2. Temperatura hodowli

W pracy badano także wpływ temperatury hodowli na hydrofobowość szczepów *Listeria monocytogenes*. Szczepy hodowano w temperaturze 30°C przez 24 godziny (rycina 7) i przez 45 dni w temperaturze 4°C (ryc. 14).

W temperaturze 30°C większość szczepów wykazywała charakter hydrofilowy (szczepy 34-X, 4-IX, 4-XI, 61, 3-VII, 15, 19, 3-V, 2-XVI). Szczep 1-IV wykazywał właściwości przejściowe. Jedynie szczep LM-1577 był hydrofobowy (ryc. 7).

W wyniku hodowli w 4°C stwierdzono, że szczepy: 34-X, 4-IX, 4-XI były hydrofilowe zaś szczepy: 61, 3-VII, 2-XVI, 15, 19, 3-V, 1-IV miały własności pośrednie. Szczep LM 1577 był hydrofobowy (ryc. 14).

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała istotny wpływ zmiany temperatury inkubacji na hydrofobowość szczepów *Listeria monocytogenes*. Dla badanych temperatur najbardziej zmienny był szczep LM-1577, 34-X oraz 15.

4.2.3. Rodzaj podłoża

Badano hydrofobowość listerii rosnących w 30°C na podłożu BHI płynnym, BHI stałym, agarze zwykłym i agarze cukrowym.

Na podstawie analizy skupień stwierdzono, że na podłożu BHI płynnym trzy szczepy (2-XVI, 3-V i 15) tworzą grupę hydrofobową zaś pozostałych pięć szczepów (61, LM-1577, 3-VII, 3-V, 1-IV) ma własności hydrofilowe (ryc.6).

Po hodowli szczepów na podłożu stałym wyróżniono grupę hydrofobową, którą tworzyły dwa szczepy (LM-1577, 1-IV) oraz hydrofilową która tworzyło dziewięć pozostałych szczepów (ryc. 7). W grupie tej można wyróżnić dwie wyraźne podgrupy. Istotnym jest, że grupy hydrofobowe na podłożu płynnym i stałym tworzyły inne szczepy.

Hodując listerie na agarze cukrowym stwierdzono dwa szczepy średnio hydrofobowe (34-X, LM-1577), zaś pozostałe można zaliczyć do hydrofilowych

(ryc.8). Ponadto na dendrogramie, można wyróżnić dwie dodatkowe podgrupy z których jedna jest wysoce hydrofilowa (34-X, LM-1577), zaś w szczepach drugiej podgrupy (4-IX, 3-VII, 3-V, 1-IV) cecha ta jest mniej wyraziście zarysowana.

W wyniku hodowli listerii na agarze zwykłym (ryc. 9.) wyróżniono grupę hydrofilową do której należały szczepy: 34-X, 4-XI, 3-V, 15, 61, 1-IV oraz wyraźnie odgraniczoną grupę szczepów (4-IX, 19, 2-XVI, 3-VII), których własności były pośrednie pomiędzy hydrofilowymi i hydrofobowymi. Jeden tylko szczep LM 1577 był wyraźnie hydrofobowy.

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała istotny wpływ zmiany rodzaju podłoża na hydrofobowość szczepów dla hodowli na agarze cukrowym.

Najbardziej zmiennymi statystycznie szczepami były: LM-1577 na podłożu BHI, 1-IV na agarze cukrowym i agarze zwykłym oraz 2-XVI na agarze cukrowym.

4.2.4. pH podłoża

Badanie wykonywano na podłożu BHI którego pH obniżano do 5.5 poprzez dodanie kwasu solnego, octowego bądź mlekowego. Stwierdzono, że obniżenie pH spowodowało zwiększenie hydrofobowości szczepów.

Zjawisko to wystąpiło szczególnie intensywnie w przypadku bakterii hodowanych na podłożu którego pH obniżano przy pomocy HCl (ryc.10). W tym przypadku wszystkie szczepy stały się średnio hydrofobowe.

Podobny rezultat uzyskano po hodowli na podłożu z kwasem octowym (ryc. 11). W tym przypadku wszystkie szczepy zachowywały się także bardzo podobnie i wykres zmian układał się na granicy, którą przyjęto jako rozdzielającą szczepy hydrofilowe i hydrofobowe.

Dodanie kwasu mlekowego miało najmniejszy wpływ na hydrofobowość szczepów. Osiem z nich (34-X, 3-VII, LM-1577, 3-V, 4-XI, 4-IX, 61, 2-XVI) można zaliczyć do średnio hydrofobowych, zaś trzy (15, 19, 1-IV) do hydrofilowych (ryc.12) co wyraźnie można zaobserwować na dołączonym dendrogramie.

Niniejsze wyniki zostały potwierdzone statystycznie. Analiza statystyczna wykazała istotny wpływ obniżenia pH hodowli wszystkimi rodzajami kwasów na hydrofobowość szczepów *L. monocytogenes*.

W przypadku poszczególnych szczepów najbardziej zmienny hydrofobowo był szczep LM-1577 na podłożu zakwaszonym kwasem octowym.

4.2.5. Wpływ dodatku NaCl

Otrzymane wyniki wskazały istnienie dwóch grup drobnoustrojów (ryc. 13). Pierwsza grupa to szczepy hydrofilowe (szczepy: 19, 61, 4-XI, 3-VII). Drugą grupą to szczepy o 50%-80% udziale drobnoustrojów hydrofobowych (szczepy: 2-XVI, 4-IX, 3-V, 34-X, LM-1577, 1-IV, 15). Na uwagę zasługuje tutaj szczep 15, który w początkowej fazie procesu wykazywał 40% udział drobnoustrojów hydrofobowych, po czym udział ten spadł do 25%.

Analiza statystyczna nie wykazała tutaj istotnych różnic. Najbardziej zmienne hydrofobowo były szczepy LM-1577, 1-IV, 3-VII.

4.2.6. Wpływ warunków beztlenowych

Szczepy hodowano na podłożu BHI stałym w 30°C i 4°C w warunkach beztlenowych (ryc.15, 16). W obu przypadkach nie stwierdzono szczepów o właściwościach hydrofobowych. Jedynie w przypadku hodowli w 4°C stwierdzono, że po 30 sekundach wytrząsania hydrofilowość szczepów zmniejszała się i po 60 sekundach ponownie wzrastała przy czym najmniej hydrofilowy był szczep LM-1577.

Statystyczna analiza porównawcza hodowli w warunkach beztlenowych na podłożu BHI w 30°C i 4°C nie wykazała istotnych różnic. Istotność różnic stwierdzono dla temperatury 30°C, porównując metodę hodowli beztlenowej z hodowlą w warunkach tlenowych.

4.2.7. Adhezyjność *Listeria monocytogenes* do oleju roślinnego

Szczepy hodowano na podłożu BHI w 30°C i 4°C (ryc.17,18). W analizie zmieniono czynnik hydrofobowy zastępując heksadekan olejem z oliwek (Fluka). W obu przypadkach stwierdzono niewielki stopień adhezji listerii do oleju. Szczepy hodowane w 30°C zachowywały się bardzo podobnie i procent komórek adherujących do oleju był bardzo niewielki. Natomiast w przypadku hodowli bakterii w 4°C można zaobserwować dwie grupy mniej i bardziej adherujące do oleju z oliwek, które są bardzo wyraźne na załączonym dendrogramie (ryc.18).

Statystyczna analiza porównawcza nie wykazała istotnych różnic w adhezyjności *L. monocytogenes* do oleju roślinnego, zarówno w przypadku hodowli na podłożu BHI w 30°C jak w i 4°C. Różnice istotne statystycznie

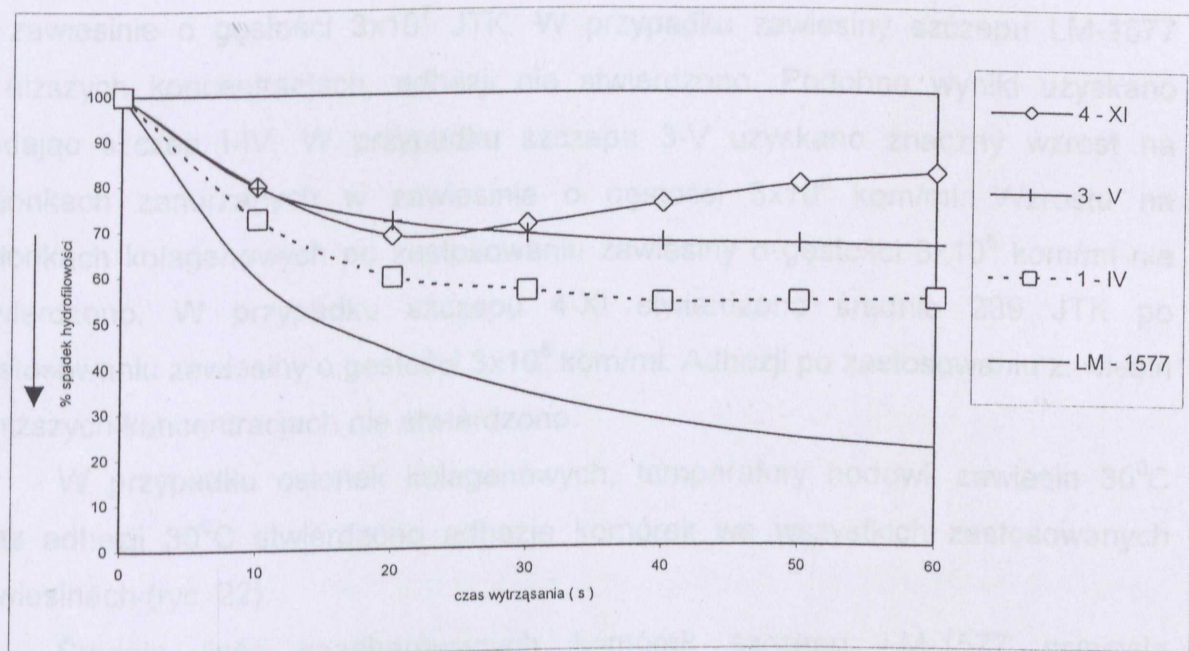
stwierdzono natomiast pomiędzy zastosowanymi czynnikami hydrofobowymi (heksadekan, olej roślinny) dla hodowli na podłożu BHI w 30°C.

Zbiorcze wyniki wpływu warunków wzrostu na hydrofobowość szczepów przedstawiono w tabeli 5.

4.3. Ocena wpływu warunków środowiskowych na adhezję szczepów *Listeria monocytogenes* do osłonek kiełbas

4.3.1. Wpływ temperatury hodowli i temperatury procesu adhezji

Badano adhezję komórek *Listeria monocytogenes* do osłonek kolagenowych i celulozowych. Analizie poddano dwa szczepy hydrofobowe (1-IV, LM-1577) i dwa hydrofilowe (4-XI, 3-V). Wykres hydrofobowości szczepów użytych do badań przedstawiono na rycinie 35.



Ryc.35. Wykres hydrofobowości szczepów *L. monocytogenes* użytych w badaniach oceny wpływu warunków środowiskowych na adhezję do osłonek kiełbas.

Proces adhezji prowadzono w temperaturach 5°C i 30°C stosując zawiesiny o gęstościach 3×10^5 , 3×10^6 , 3×10^7 , 3×10^8 kom/ml.

W przypadku osłonek celulozowych i zawiesiny pochodzącej z 24-godzinnej hodowli w temperaturze 30°C oraz temperaturze adhezji 5°C stwierdzono obecność komórek na osłonce tylko po zastosowaniu zawiesiny o gęstości 3×10^8 kom/ml. Średnia ilość zaadherowanych komórek wyniosła: szczep LM-1577 - 258 JTK (jednostek tworzących kolonie), szczep 1-IV - 200 JTK, szczep 3-V - 2 JTK i szczep 4-XI - 200 JTK (ryc.19).

Po podwyższeniu temperatury procesu adhezji do 30°C uzyskano bardzo podobne wyniki. Średnia ilość zaadherowanych do osłonek komórek wyniosła odpowiednio: szczep LM-1577 273 JTK, 1-IV 337 JTK, 3-V 41 JTK i 4-XI 263 JTK. W przypadku szczepu 4-XI stwierdzono także pojedyncze kolonie w zastosowaniu zawiesin o niższych gęstościach (ryc.20).

Przyleganie listerii do osłonek kolagenowych z hodowli prowadzonej w temperaturze 30°C i temperaturze procesu adhezji 5°C było znacznie intensywniejsze (ryc. 21). Stwierdzono duże ich ilości po zastosowaniu zawiesin o gęstościach 3×10^8 , 3×10^7 i 3×10^6 kom/ml. Średnia ilość adherujących komórek szczepu LM-1577 wyniosła 286 JTK przy zawiesinie o gęstości 3×10^8 i 80 JTK w zawiesinie o gęstości 3×10^7 JTK. W przypadku zawiesiny szczepu LM-1577 o niższych koncentracjach, adhezji nie stwierdzono. Podobne wyniki uzyskano badając szczep 1-IV. W przypadku szczepu 3-V uzyskano znaczny wzrost na osłonkach zanurzanych w zawiesinie o gęstości 3×10^6 kom/ml. Wzrostu na osłonkach kolagenowych po zastosowaniu zawiesiny o gęstości 3×10^5 kom/ml nie stwierdzono. W przypadku szczepu 4-XI stwierdzono średnio 289 JTK po zastosowaniu zawiesiny o gęstości 3×10^8 kom/ml. Adhezji po zastosowaniu zawiesin o niższych koncentracjach nie stwierdzono.

W przypadku osłonek kolagenowych, temperatury hodowli zawiesin 30°C oraz adhezji 30°C stwierdzono adhezję komórek we wszystkich zastosowanych zawiesinach (ryc. 22).

Średnia ilość zaadherowanych komórek szczepu LM-1577 wyniosła odpowiednio: 292 JTK - zawiesina 3×10^8 kom/ml, 275 JTK - zawiesina - 3×10^7 kom/ml, 200 JTK - zawiesina 3×10^6 kom/ml. Adhezji w zawiesinie 3×10^5 kom/ml nie stwierdzono.

Dla szczepu 1-IV stwierdzono średnio 287 JTK po adhezji w zawiesinie 3×10^8 kom/ml drobnoustrojów oraz 33 JTK po adhezji w zawiesinie 3×10^7 kom/ml. W niższych koncentracjach zawiesin adhezji nie stwierdzono. Podobne wyniki

uzyskano badając szczepu 3-V. Szczepu 4-XI adherował najintensywniej ponieważ znaczne ilości komórek stwierdzono po zastosowaniu zawiesin od 3×10^8 do 3×10^5 kom/ml.

Przeprowadzona analiza wyników adhezji szczepów hodowanych w 30°C wykazała następujące różnice statystyczne:

- a) pomiędzy rodzajem osłonki (kolagenowa i celulozowa),
- b) pomiędzy szczepem 4-XI, LM-1577, 3-V,
- c) temperaturą, w której prowadzono adhezję wyłącznie dla osłonek kolagenowych.

Po hodowli 45-dniowej w temperaturze 4°C , przy temperaturze procesu adhezji 5°C stwierdzono obecność zaadherowanych komórek po adhezji do osłonek celulozowych we wszystkich zawiesinach (ryc.23).

Średnia ilość zadherowanych komórek wyniosła dla szczepu LM-1577: 271 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^8 kom/ml, 268 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^7 kom/ml i 237 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^6 kom/ml. Po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^5 kom/ml, komórek szczepu LM-1577 na osłonkach nie stwierdzono.

Dla szczepu I-IV stwierdzono średnio: 268 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^8 kom/ml, 254 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^7 kom/ml i 5 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^6 kom/ml. Po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^5 kom/ml, komórek szczepu I-IV na osłonce nie stwierdzono.

Dla szczepu 3-V stwierdzono średnio: 255 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^8 kom/ml, 240 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^7 kom/ml, 235 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^6 kom/ml i 18 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^5 kom/ml.

Dla szczepu 4-XI stwierdzono średnio: 264 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^8 kom/ml, 236 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^7 kom/ml, 201 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^6 kom/ml i 5 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^5 kom/ml.

W przypadku osłonek celulozowych i 45-dniowej hodowli w temperaturze 4°C i temperaturze adhezji 30°C stwierdzono adhezję listerii do osłonek w we wszystkich zawiesinach (ryc. 24).

Średnia ilość adherujących komórek szczepu LM-1577 w zawiesinie o gęstości 3×10^8 kom/ml wyniosła 265 JTK, w zawiesinie o gęstości 3×10^7 kom/ml 243 JTK, 197 JTK w zawiesinie o gęstości 3×10^6 kom/ml i 2 JTK w zawiesinie o gęstości 3×10^5 kom/ml.

W przypadku szczepu I-IV stwierdzono na osłonkach średnio 265 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^8 kom/ml, 12 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^7 kom/ml i 2 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^6 kom/ml. Po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^5 kom/ml komórek szczepu I-IV nie stwierdzono.

W zawiesinie o gęstości 3×10^8 kom/ml szczepu 3-V adherowało do osłonek średnio 238 JTK oraz 4 JTK w zawiesinie o gęstości 3×10^7 kom/ml. Adhezji w niższych gęstościach zawiesin, komórek szczepu 3-V na osłonkach celulozowych nie stwierdzono.

W zawiesinie szczepu 4-XI o gęstości 3×10^8 kom/ml adherowało średnio 153 JTK, 18 JTK w zawiesinie o gęstości 3×10^7 kom/ml i 3 JTK w zawiesinie o gęstości 3×10^6 kom/ml. Adhezji do osłonek w niższych gęstościach zawiesin nie stwierdzono.

W przypadku osłonek kolagenowych hodowli 45-dniowej w temperaturze 4°C i temperaturze procesu adhezji 5°C stwierdzono adhezję komórek do osłonek w we wszystkich zawiesinach (ryc.25).

Średnia ilość adherujących komórek szczepu LM-1577 w zawiesinie o gęstości 3×10^8 kom/ml wyniosła 297 JTK, 284 JTK w zawiesinie o gęstości 3×10^7 kom/ml, 251 JTK w zawiesinie o gęstości 3×10^6 kom/ml. i 236 JTK w zawiesinie o gęstości 3×10^5 kom/ml.

Dla szczepu I-IV liczba komórek adherujących wyniosła średnio 283 JTK w zawiesinie o gęstości 3×10^8 kom/ml, 285 JTK w zawiesinie o gęstości 3×10^7 kom/ml, 263 JTK w zawiesinie o gęstości 3×10^6 drobnoustrojów i 242 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^5 kom/ml.

W przypadku szczepu 3-V stwierdzono średnio 275 JTK komórek adherujących do osłonek w zawiesinie o gęstości 3×10^8 kom/ml, 266 JTK w zawiesinie o gęstości 3×10^7 kom/ml, 207 JTK w zawiesinie o gęstości 3×10^6 kom/ml i 33 JTK w zawiesinie o gęstości 3×10^5 drobnoustrojów.

Adhezja szczepu 4-XI wyniosła odpowiednio: 201 JTK - zawiesina gęstości 3×10^8 kom/ml, 196 JTK - zawiesina o gęstości 3×10^7 kom/ml, 192 JTK - zawiesina o gęstości 3×10^6 kom/ml i 15 JTK - zawiesina o gęstości 3×10^5 kom/ml.

W dalszej części pracy badano osłonki kolagenowe oraz 45-dniową hodowlę w temperaturze 4°C zaś proces adhezji prowadzono w temperaturze 30°C . Stwierdzono, że adhezja zachodziła w we wszystkich zawiesinach (ryc.26).

Średnia ilość adherujących komórek szczepu LM-1577 wyniosła w zawiesinie o gęstości 3×10^8 kom/ml 242 JTK, 207 JTK w zawiesinie o gęstości 3×10^7 kom/ml, 186 JTK w zawiesinie o gęstości 3×10^6 kom/ml i 115 JTK w zawiesinie o gęstości 3×10^5 kom/ml.

Dla szczepu I-IV stwierdzono średnio 235 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^8 kom/ml, 235 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^7 kom/ml, 206 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^6 kom/ml i 203 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^5 kom/ml.

Dla szczepu 3-V stwierdzono średnio 232 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^8 kom/ml, 248 JTK po adhezji w zawiesinie o 3×10^7 kom/ml, 81 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^6 kom/ml. W zawiesinie o gęstości 3×10^5 kom/ml adhezji nie stwierdzono.

Dla szczepu 4-XI stwierdzono średnio 200 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^8 kom/ml, 142 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^7 kom/ml, 100 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^6 kom/ml i 4 JTK po adhezji w zawiesinie o gęstości 3×10^5 kom/ml.

Przeprowadzona analiza wyników adhezji szczepów hodowanych w 30°C wykazała następujące różnice statystyczne:

- a) pomiędzy rodzajem osłonki (kolagenowa i celulozowa), tylko przy gęstości zawiesiny 3×10^5 komórek dla szczepów LM-1577 i I-IV,
- b) pomiędzy szczepem 4-XI, LM-1577, 3-V,
- c) temperaturą, w której prowadzono adhezję- dla szczepów LM-1577 i I-IV przy gęstości zawiesiny 3×10^5 komórek.

Otrzymane wyniki wskazują na większą podatność osłonek kolagenowych w porównaniu z osłonekami celulozowymi na adhezję do nich szczepów

L. monocytogenes. Adhezja w temperaturze 5⁰C była wyższa w porównaniu z procesem prowadzonym w temperaturze 30⁰C. Otrzymane dane wykazały także, że lepiej adherowały szczepy hydrofobowe LM-1577 i I-IV.

4.3.2. Wpływ warunków beztlenowych

W pracy badano adhezję do osłonek naturalnych (jelita), kolagen, celuloza, poliamid drobnoustrojów *Listeria monocytogenes* LM-1577 i 1-IV hodowanych w warunkach tlenowych i beztlenowych. Drobnoustroje były hodowane na podłożu BHI agar w temp. 30⁰ C (ryc. 27,28).

W przypadku szczepu hydrofobowego LM-1577, największą adhezję do osłonek jelitowych stwierdzono po zastosowaniu zawiesin o gęstościach 10⁶ i 10⁵ kom/ml. Stwierdzona ilość wyrosłych kolonii przekraczała poziom policzalności - > 300. Po zastosowaniu zawiesin 10³ i 10⁴ kom/ml ilości wyrosłych kolonii były o połowę niższe (średnio 150 JTK) (ryc. 27)

Po zastosowaniu hodowli w warunkach beztlenowych ilość adherujących do osłonek jelitowych drobnoustrojów istotnie zmalała w przypadku zawiesin 10³, 10⁴ i 10⁵ kom/ml odpowiednio o 75%, 40%, 35%. W zawiesinie 10⁶ kom/ml ilość adherujących komórek była na podobnym poziomie jak w zawiesinach sporządzonych z hodowli w warunkach tlenowych.

W przypadku szczepu hydrofilowego 1-IV i osłonek jelitowych najwięcej drobnoustrojów adherowało (na granicy policzalności) w zawiesinie 10⁶ kom/ml. W zawiesinach 10⁵, 10⁴ i 10³ kom/ml ilości zaadherowanych drobnoustrojów wyniosły średnio 250, 130 i 98 JTK.

Po hodowli w warunkach beztlenowych szczepu hydrofilowego i osłonki jelitowej ilość komórek adherujących była podobna w zawiesinie 10⁶ kom/ml, a w przypadku pozostałych zawiesin była średnio o 50% niższa w porównaniu z hodowlą w warunkach tlenowych wykazując istotne różnice.

Adhezja do osłonki kolagenowej w zawiesinie 10⁶ kom/ml szczepu hydrofobowego LM-1577 wyniosła średnio 299 JTK co jest ilością na granicy policzalności. W pozostałych zawiesinach ilość zaadherowanych drobnoustrojów zmalała do 62 JTK – zawiesina 10⁵ kom/ml, 49 JTK – zawiesina 10⁴ kom/ml i 9 JTK - zawiesina 10³ kom/ml.

Adhezyjność hodowli beztlenowej wyniosła: odpowiednio 97, 17, 1 począwszy od zawiesiny 10^6 kom/ml do 10^4 kom/ml. W zawieszynie 10^3 kom/ml adhezji nie stwierdzono. Dla szczepu hydrofilowego 1-IV i osłonki kolagenowej w warunkach hodowli tlenowej ilości zaadherowanych komórek wyniosły średnio 285, 47, 5 JTK począwszy od stężenia 10^6 , a w przypadku dawki 10^3 nie stwierdzono obecności zaadherowanych komórek listerii.

W przypadku hodowli beztlenowej stwierdzono zmniejszenie ilości zaadherowanych komórek do poziomu średnio 68 JTK dla stężenia 10^6 i 5 JTK dla stężenia 10^5 .

Porównując adhezyjność szczepu hydrofobowego i hydrofilowego do osłonek kolagenowych, ilość zaadherowanych komórek hodowanych w warunkach próżniowych była niższa o ponad 50% w przypadku szczepu hydrofilowego. W przypadku niższych stężeń bakterii nie stwierdzono adherencji komórek listerii.

Przeprowadzona porównawcza analiza statystyczna dla osłonek kolagenowych wykazała istotne różnice w przypadku zmiany hodowli z tlenowej na beztlenową dla obydwu szczepów i wszystkich gęstości zawiesin.

Nie stwierdzono adhezji komórek listerii zarówno szczepu hydrofobowego jak i hydrofilowego hodowanych w warunkach tlenowych jak i beztlenowych do osłonek wiskozowych i bakteriostatycznych.

4.3.3. Wpływ powleczenia osłonek filmem tłuszczowym

Badano adhezję szczepu 1-IV *Listeria monocytogenes* do osłonek pokrytych filmem tłuszczowym stałym lub ciekłym. Osłonki były powlekane filmem w zależności od zastosowanego tłuszczu; w przypadku tłuszczu stałego po uprzednim podgrzaniu w temp 60°C , w przypadku olejów płynnych (olej z oliwek, mieszanina nienasyconych kwasów tłuszczowych) na zimno. Czas powlekania ustalono na 10 minut. Do tego etapu doświadczenia wybrano szczep hydrofilowy 1-IV ze względu na jego pochodzenie - środowisko przemysłu mięsnego. Próbami kontrolnymi były analogiczne doświadczenia z osłonkami nie pokrytymi tłuszczem (ryc. 29).

Adhezja listerii do osłonek jelitowych powleczonych filmem z tłuszczu stałego (ryc. 30) była o 20% niższa w zawieszinach o mniejszej koncentracji drobnoustrojów (10^5 , 10^4 i 10^3 kom/ml).

W przypadku osłonek kolagenowych stwierdzono także znaczny spadek ilości zaadherowanych bakterii. W zawiesinie 10^6 kom/ml wyniósł on średnio z 300 JTK do 79 JTK dla osłonki powleczonej filmem, w zawiesinie 10^5 kom/ml z 119 JTK do 23 JTK i w zawiesinie 10^4 kom/ml średnio z 38 JTK do 4 JTK. Natomiast w zawiesinie o najniższej koncentracji (10^3) stwierdzono brak różnic w ilości adherujących listerii

Powlekanie tłuszczem osłonek sztucznych - celuloza, poliamid nie wpłynęło w sposób istotny statystycznie na ilość adherujących listerii przy czym w zawiesinach o niższej koncentracji nie stwierdzono adhezji listerii zarówno w próbach powleczonych filmem z tłuszczu stałego jak i kontrolnych.

Powleczenie z olejem z oliwek osłonki jelitowej nie wpłynęło na adhezję listerii. Stwierdzone różnice były nieistotne statystycznie (ryc. 31, 32).

W przypadku osłonek kolagenowych powleczonych filmem płynnym z oleju z oliwek podobnie jak w przypadku tłuszczu stałego zanotowano obniżenie ilości adherujących komórek. W zawiesinie o koncentracji 10^6 kom/ml nastąpił spadek z 300 JTK do 76 JTK, w zawiesinie 10^5 kom/ml z 119 JTK do 23 JTK, w zawiesinie 10^4 kom/ml z 38 JTK do 3 JTK. W zawiesinie o najniższej koncentracji nie stwierdzono istotnych różnic.

Adhezja do osłonek sztucznych - celuloza, poliamid pokrytych olejem, podobnie jak w przypadku osłonek nie powlekanych tłuszczem była bardzo niska. Przyleganie komórek bakterii do osłonek jelitowych powleczonych filmem z mieszaniny nienasyconych kwasów tłuszczowych była podobna w zawiesinach 10^6 i 10^5 . Przy niższych koncentracjach zawiesin (10^4 i 10^3 kom/ml) zaobserwowano znaczny spadek ilości adherujących bakterii.

Znaczny spadek adhezji odnotowano także dla osłonek kolagenowych powleczonych tym rodzajem filmu. Spadek ten wyniósł z 300 JTK do 8 JTK dla koncentracji 10^6 , z 119 JTK do 7 JTK dla koncentracji 10^5 , z 38 JTK do 3 JTK dla koncentracji 10^4 kom/ml. W zawiesinach o najniższej koncentracji nie stwierdzono adhezji listerii.

W przypadku osłonek sztucznych (celuloza, poliamid) zaobserwowano nieistotny statystycznie wzrost ilości zaadherowanych komórek w zawiesinie o najwyższej koncentracji. W niższych koncentracjach bakterii adhezji nie zanotowano.

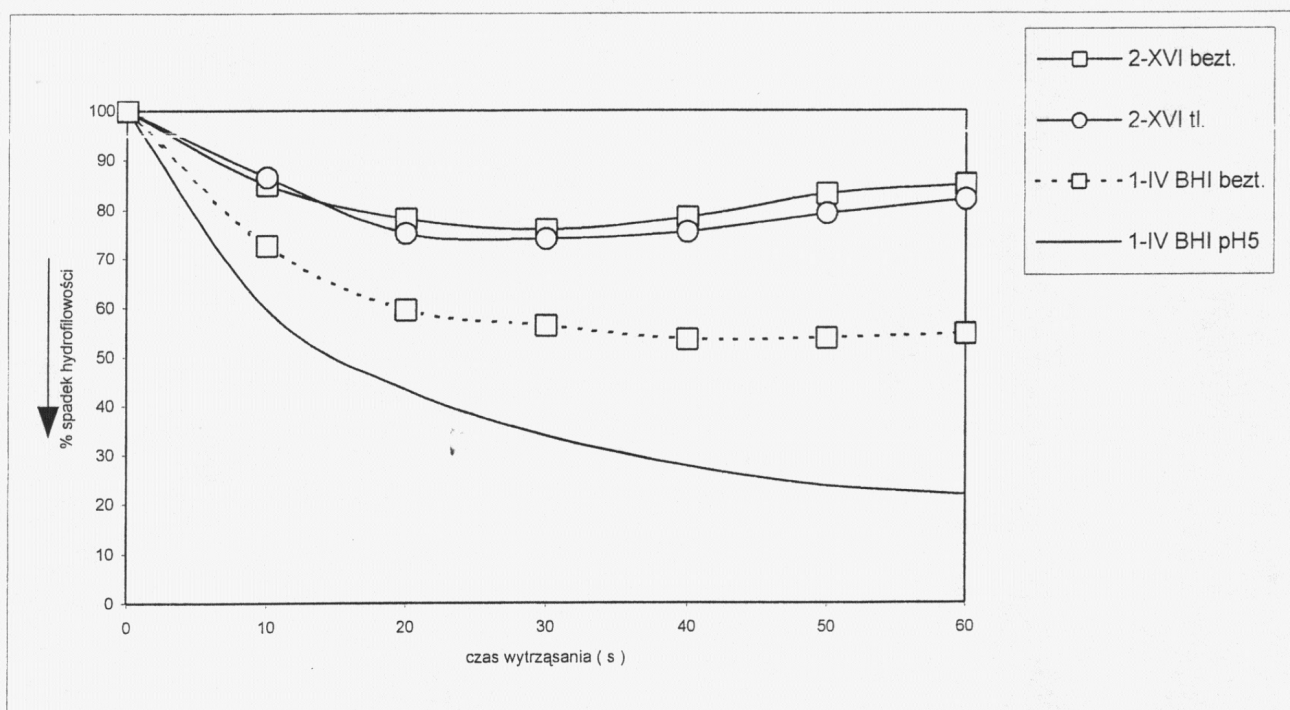
4.4. Ocena patogenności *Listeria monocytogenes* dla myszy

Badano wpływ dwóch szczepów *Listeria monocytogenes*: 1-IV i 2-XVI.

Formę hydrofobową 1-IV uzyskiwano hodując bakterie w 30⁰C na podłożu BHI o pH 5.0 (dodatek HCl) w warunkach tlenowych.

Formę hydrofilową 1-IV uzyskiwano hodując bakterie 30⁰C na podłożu BHI w warunkach beztlenowych.

Formę hydrofilową 2-XVI uzyskiwano hodując bakterie 30⁰C na podłożu BHI w warunkach tlenowych i beztlenowych. Wykres hydrofobowości szczepów użytych do badań przedstawiono na ryc. 36.



Ryc.36. Wykres hydrofobowości szczepów *L. monocytogenes* użytych do badań oceny stopnia patogenności dla myszy.

Każdy szczep podawano myszom *per os*:

- w zbuforowanej soli fizjologicznej
- w zawiesinie olejowo-wodnej.

24 godziny po podaniu szczepów zwierzęta zabijano oraz sekcjonowano pobierając do analizy wątrobę, śledzionę oraz odcinek jelita cienkiego.*Otrzymane wyniki przedstawiono na ryc. 34.

Po podaniu myszom formy hydrofobowej stwierdzono w wątrobach $1,4 \times 10^5$ JTK/g badanej próby. W przypadku szczepu podanego w zawiesinie olejowo-wodnej

odnotowano ilości rzędu $1,2 \times 10^3$ JTK/g badanej próby. W przypadku podania szczepu z hodowli beztlenowej odnotowano $1,4 \times 10^5$ JTK/g oraz $8,8 \times 10^3$ JTK/g badanej próby po zastosowaniu zawiesiny olejowo-wodnej.

Po podaniu myszom form hydrofilowych stwierdzono w wątrobach w ilości rzędu $1,06 \times 10^7$ JTK/g. Ten sam szczep podany w zawieszynie olejowej dał ilości rzędu $9,9 \times 10^6$ JTK/g wątroby. W przypadku podania szczepu z hodowli beztlenowej odnotowano $4,8 \times 10^3$ JTK/g badanej próby, oraz dla szczepu podanego w zawieszynie olejowo-wodnej $3,9 \times 10^4$ JTK/g.

Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic pomiędzy dwoma badanymi szczepami.

Badając śledziony zakażonych myszy stwierdzono obecność szczepu hydrofobowego 1-IV w ilości $8,7 \times 10^4$ JTK/g badanej próby. Dla tego samego szczepu podanego w zawieszynie olejowej odnotowano $3,7 \times 10^5$ JTK/g badanej próby. W przypadku podania szczepu z hodowli beztlenowej odnotowano $1,03 \times 10^7$ JTK/g badanej próby, oraz $6,2 \times 10^4$ JTK/g badanej próby dla szczepu podanego w zawieszynie olejowej.

W badaniach śledzion zakażonych myszy stwierdzono obecność formy hydrofilowej w ilości $3,6 \times 10^6$ JTK/g badanej próby. Ten sam szczep podany w zawieszynie olejowo-wodnej dał $1,4 \times 10^5$ JTK/g badanej próby. W przypadku podania szczepu z hodowli beztlenowej odnotowano $2,1 \times 10^4$ JTK/g badanej próby, oraz $2,8 \times 10^4$ JTK/g badanej próby dla szczepu podanego w zawieszynie olejowo-wodnej.

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała istotne różnice dla formy hydrofobowej hodowanej w warunkach beztlenowych i tej samej formy hodowanej w warunkach beztlenowych i podanej w zawieszynie olejowo-wodnej. Istotne różnice odnotowano również pomiędzy formą hydrofobową i hydrofilową hodowaną w warunkach beztlenowych.

Po podaniu myszom formy hydrofobowej stwierdzono w jelicie cienkim $9,5 \times 10^5$ JTK/g badanej próby. Dla tej samej formy podanej w zawieszynie olejowo-wodnej odnotowano ilości $3,0 \times 10^4$ JTK/g badanej próby. W przypadku podania szczepu z hodowli beztlenowej stwierdzono $4,1 \times 10^6$ JTK/g oraz $3,8 \times 10^3$ JTK/g dla szczepu podanego w zawieszynie olejowo-wodnej.

Po podaniu formy hydrofilowej stwierdzono $8,2 \times 10^5$ JTK/g badanej próby. Ta sama forma podana w zawiesinie olejowo-wodnej dała $1,0 \times 10^3$ JTK/g badanej próby. W przypadku podania szczepu z hodowli beztlenowej odnotowano $2,4 \times 10^4$ JTK/g oraz $5,3 \times 10^3$ JTK/g dla szczepu podanego w zawiesinie olejowo-wodnej.

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała istotne różnice pomiędzy formą hydrofobową hodowaną w warunkach beztlenowych oraz tą samą formą hodowaną w warunkach beztlenowych i podaną w zawiesinie olejowo-wodnej. Istotne różnice odnotowano również pomiędzy formą hydrofobową i hydrofilową hodowaną w warunkach beztlenowych.

5. DYSKUSJA

Podstawową przyczyną podjęcia prezentowanych w pracy badań było kilka podawanych w literaturze faktów.

Jednym z najważniejszych to, że listerie są bardzo powszechnymi drobnoustrojami w żywności. Spotyka się je w produktach mleczarskich a szczególnie serach miękkich oraz twarogach (Rudol i wsp., 2001, Rudol i wsp., 2001, Manzano i wsp. 1997, Margolles i wsp., 1998, Margolles i wsp., 2000, Harvey 2001., Delgado da Silva i wsp., 2001). Także produkty mięsne są często zanieczyszczone *Listeria monocytogenes* i w niektórych przypadkach odsetek prób dodatnich jest rzędu od kilku do kilkudziesięciu procent (Levine i wsp., 2001, Chasseignaux i wsp., 2001, Dąbrowski 2001, Kwiatek 1993, Kwiatek 2002). Wysoki stopień zanieczyszczenia listeriami występuje w mięsie wołowym i wieprzowym oraz produktach mięsnych dostępnych w handlu detalicznym na terenie Pomorza Zachodniego (Dąbrowski i wsp., 2001). Następną grupą to produkty rybne a szczególnie ryby wędzone. W tym przypadku poziomy zanieczyszczeń są również wysokie i osiągają wartości 77 prób dodatnich na 113 przebadanych, szczególnie w odniesieniu do ryb wędzonych na zimno (Dąbrowski i wsp., 2000, Dąbrowski, 2001, Destro, 2000, Eklund i wsp., 1995, Farber 1991, Johansson wsp., 1999, Karunasagar i wsp., 2000, Brett i wsp., 1998).

Biorąc pod uwagę tak wysoką częstość zanieczyszczenia żywności tymi drobnoustrojami zastanawiające jest dlaczego występuje tak niska liczba zachorowań. Sugeruje się, że przyczyną tego jest fakt, że w żywności listerie najczęściej występują w koncentracjach do 10^3 JTK/g i jest to dawka niewystarczająca do wywołania zachorowania (Dąbrowski i wsp., 2001, Kooksey i wsp., 1993). Jednakże długie okresy trwałości żywności sięgające niekiedy do 3 miesięcy stwarzają warunki do namnożenia się nawet do koncentracji 10^6 JTK/g, a jest to już dawka groźna dla konsumentów.

Wątpliwością, która nasuwa się analizując wyżej przedstawione dane to, że być może szczepy *Listeria monocytogenes* izolowane z żywności nie są w pełni chorobotwórcze. Jej poparciem może być praca Awery, w której patogenność była badana testem na zarodkach kurzych (Avery i wsp., 1997). Stwierdzono w niej różnice pomiędzy szczepami klinicznymi i izolowanymi z mięsa. Oba rodzaje

szczepów były namnażane *in vitro* w 37°C a następnie przechowywane w 4°C przez 4 tygodnie. Szczepy kliniczne pozostawały patogenne dla zarodków natomiast izolowane z żywności traciły patogenność. Praca ta nie została jednak potwierdzona na innych zwierzętach przez innych autorów. Obecnie zatem raczej sugeruje się że pochodzenie szczepów nie wpływa na ich zjadliwość. Szczepy wyizolowane z żywności posiadają, podobnie jak kliniczne, cechy zjadliwości jak aktywność hemolityczna, internalina, białko polimeryzujące aktynę ActA, białko adhezyjne Ami (Vázquez-Boland J.A. i wsp., 2001, Jacquet i wsp., 2002) jak również wykazują podobieństwo genetyczne (Ojieniyi i wsp., 2000).

Sugerowano także że szczepy medyczne, powodujące schorzenia u ludzi są serotypu 4b, natomiast w środowisku i w żywności bytują inne serotypy a szczególnie 1/2a (Salamina i wsp., 1996). Wskazuje na to praca Czupryńskiego i wsp., w której autorzy wykazali, że szczepy 4b są bardziej patogenne po do żołądkowym podaniu myszom, niżeli szczepy 1/2b i 1/2a. Ponadto szczepy patogenne lepiej przeżywały niskie pH sztucznego soku żołądkowego (Czupryński i wsp., 2002). Sugeruje to, że przyczyną niskiej liczby zachorowań na listeriozę przy jednoczesnym bardzo wysokim stopniu zanieczyszczenia żywności tymi bakteriami są dodatkowe, nieznanne jeszcze elementy.

Jednym z czynników, który może wpływać na patogenność listerii jest hydrofobowość drobnoustrojów. Jak pisano we wstępie szereg danych z piśmiennictwa wskazuje, że szczepy patogenne dla człowieka są hydrofobowe zaś izolowane ze środowiska hydrofilowe. Maylheuc i wsp. wykazali, że szczepy niepatogenne listerii (niehemolityczny mutant *L. monocytogenes* i niepatogenna *L. innocua*), mają własności powierzchni, takie jak ładunek, energia powierzchni komórki, hydrofobowość, inne niżeli szczep patogeny. Szczep patogeny był najbardziej hydrofobowy (Meylheuc T. i wsp., 2002).

Do badania hydrofobowości drobnoustrojów używa się kilku metod. Pierwsza z nich to test agregacji bakterii w siarczanie amonu (salt solution aggregation- SAT). Następną metodą to badanie absorpcji bakterii w kolumnach wypełnionych hydrofobowym nośnikiem tzw. hydrofobowa interakcyjna chromatografia (hydrophobic interaction chromatography, HIC). Innym sposobem jest ocena adhezji drobnoustrojów do nitrocelulozowych filtrów (adhesion to nitrocellulose filters, NCF) (Gospodarek, 1994, Ławrynowicz i wsp., 1985).

W pracy hydrofobowość szczepów *Listeria monocytogenes* badano przy użyciu metody MATH (microbial adhesion to hydrocarbons) – adhezji komórek do substancji hydrofobowej jaką był heksadekan. W metodzie tej zawiesinę bakterii wytrząsa się z heksadekanem przez 60 sekund i badając co 10 sekund gęstość optyczną zawiesiny. W przypadku, gdy w zawiesinie są komórki, których powierzchnia ma własności hydrofobowe adherują one do warstwy heksadekanu i gęstość optyczna zawiesiny maleje.

Do badania hydrofobowości zdecydowano się używać heksadekan ponieważ jest to związek najczęściej używany w tego typu badaniach. W publikacji Giovanacci i wsp., jak i we własnych obserwacjach stwierdzono, że adhezja listerii do tego węglowodoru osiąga najwyższe wartości (Giovanacci i wsp., 2000).

Następną kwestią było przyjęcie, który szczep uznajemy za szczep hydrofobowy lub hydrofilowy. W wykonanych we wstępnej części pracy badaniach nie znaleziono szczepu, który w 100% adherowałby do heksadekanu, czyli byłby to w pełni szczep hydrofobowy, bądź nie następowałby spadek gęstości optycznej czyli byłby to szczep hydrofilowy. Najczęściej z zawieszonych w soli fizjologicznej listerii tylko część adherowała do heksadekanu. Wskazywał na to spadek gęstości optycznej, zawiesiny od kilku do kilkudziesięciu procent. Zjawisko to występowało zarówno w zawiesinie sporządzonej z hodowli płynnej, jak i ze stałej. Świadczy to, że znajdujące się w zawiesinie drobnoustroje mają różną budowę zewnętrznych składników ściany komórkowej, co być może spowodowane jest różnymi fazami rozwoju fizjologicznego. Takimi fazami można by określić stan przed podziałem bakterii, w trakcie podziału i po podziale. Poparciem tej tezy są badania przeprowadzone w pierwszej części pracy. Określano w niej hydrofobowość *L. monocytogenes* w trakcie faz rozwoju logarytmicznego. Wyniki wykazały, że w zależności od fazy rozwoju hodowli, drobnoustroje stają się bardziej hydrofilowe bądź hydrofobowe. Ponieważ nie jest możliwa jednoznaczna ocena hydrofobowości zawiesiny bakteryjnej w niniejszych badaniach przyjęto, że szczep w danych warunkach jest hydrofilowy gdy tylko do 30 % komórek adherowało do heksadekanu, co na wykresach uwidoczniło jako spadek hydrofilowości do 70%. Gdy procent komórek adherujących wynosił od 30 do 70% taki szczep uznawano jako pośredni. Natomiast, gdy w zawiesinie pozostawało do 30% komórek nieadherujących szczep określano jako hydrofobowy.

Niekiedy także obserwowano, że gęstość zawiesiny początkowo malała co wskazywało na to, że kolejne porcje komórek są adsorbowane do warstwy heksadekanu aby następnie ponownie wzrosnąć. To nieopisywane i nieomawiane dotychczas w piśmiennictwie zjawisko można wytłumaczyć tym, że zewnętrzna hydrofobowa warstwa ściany, (prawdopodobnie warstwa S lub jej pewne elementy) jest słabo związana z resztą ściany komórkowej. Gwałtownie wytrząsane komórki są uwalniane z heksadekanu do warstwy wodnej, zaś elementy odpowiedzialne za hydrofobowość pozostają w heksadekanie stąd komórka staje się ponownie hydrofilowa. Sugestia ta znajduje poparcie w pracy Smoot. Autor stwierdził, że dodatek trypsyny do medium zawieszającego powoduje ponad 90% redukcję adhezji *Listeria monocytogenes* ScotA do powierzchni stalowych i gumowych (Smoot, 1997). Medrzycka (1991) donosi, że zjawisko to może być związane z punktem izoelektrycznym szczepu bakteryjnego, przesunięcie którego może doprowadzić do zmian sił przylegania lub odpychania względem kropli heksadekanu lub innych związków niepolarnych.

W piśmiennictwie najczęściej podaje się, że *Listeria monocytogenes* jest gatunkiem hydrofilowym (Dickson i wsp. 1989, Mafu i wsp. 1991). Są jednak także autorzy sugerujący, że to bakterie hydrofobowe (Al – Makhlafi i wsp., 1995, Maisnier-Patin i wsp., 1996, Benedict, 1990). Przedstawione w niniejszej pracy badania tłumaczą tę rozbieżność. Zależy to bowiem od własności badanego szczepu. Hodując listerie w optymalnych warunkach, a popularnie przyjmuje się, że jest to bogate podłoże mózgowo sercowe (BHI) i temperatura 30⁰C, większość szczepów jest hydrofilowa, niektóre jednak wykazują wysoki stopień powinowactwa do heksadekanu co świadczy o ich hydrofobowości.

Drugim i zasadniczym elementem wpływającym na omawianą cechę szczepów są warunki hodowli. W piśmiennictwie brak jest kompleksowych badań nad wpływem warunków hodowli oraz zróżnicowania szczepowego na hydrofobowość. O ile prowadzono tego typu badania, to najczęściej dotyczyły one wzorcowego, patogennego szczepu ScottA, nie szczepów wyizolowanych ze środowiska. W przypadku niniejszej pracy używano także jeden szczep z amerykańskiej kolekcji ATCC - LM 1577. We wszystkich badaniach szczep ten zachowywał się inaczej niżeli szczepy wyizolowane z żywności. Prowadzone badania nie miały na celu wykazania różnic między szczepami klinicznymi a środowiskowymi. Dlatego zdecydowano się na użycie tylko jednego szczepu

wzorcowego - klinicznego. Nie pozwala to zatem na wyciągnięcie wniosków o różnicach w hydrofobowości szczepów klinicznych i środowiskowych.

W pracy badano oddziaływanie kilku rodzajów podłoży stałych i jednego płynnego. Podjęcie tych badań spowodowane było tym, że warunki hodowli na podłożu stałym i płynnym są kompletnie odmienne biorąc pod uwagę dostęp komórek do substancji odżywczych, koncentrację produktów przemiany materii, oraz wzajemne oddziaływania komórek. *Listerie* posiadają zdolność rozmnażania się w warunkach próżniowych, a jak wiadomo warunki takie stosowane są w przechowywaniu żywności. Określano także wpływ temperatury 4°C, w której one swobodnie rozmnażają się, a tego typu temperatury są często stosowane w przechowywaniu produktów żywnościowych. Zestawienie zbiorcze (Tabela.5, ryc.33) uwidacznia, że szczep LM-1577 oraz szczepy 3-V, 1-IV szczególnie łatwo przekształcały się w formę hydrofobową, natomiast szczep 4-IX najczęściej pozostawał hydrofilowy. Pozwala to na postawienie tezy, że wśród szczepów *Listeria monocytogenes* są szczepy przekształcające się w hydrofobowe oraz pozostające hydrofilowymi bez względu na warunki hodowli. Tabela 5, zamieszczona w pracy obrazuje także, że przy obniżaniu pH środowiska hodowlanego szczepy stają się hydrofobowe. Szczególnie silnie oddziaływał kwas solny, po zastosowaniu którego wszystkie szczepy stały się hydrofobowe. Mniejszy wpływ ma kwas mlekowy lub octowy. Ponieważ kwasy te są elementem przemian metabolicznych, stąd być może ich działanie modulujące własności ściany komórkowej listerii jest znacznie mniejsze. *Listeria monocytogenes* należy do drobnoustrojów zdolnych przeżyć w pH do 3,5. Przeżycie w tych warunkach uzależnione jest od wcześniejszej adaptacji w nieco wyższym pH 5,5. Adaptacja do tych warunków umożliwia im bytowanie w żywności kwaśnej jak fermentowane produkty mleczne (Gahan i wsp., 1996). Uzyskane badania wykazują, że adaptacja prowadzi także do znacznych zmian własności powierzchni komórki.

Ważnym parametrem hodowli redukującym hydrofilowość szczepów jest także hodowla w niskiej temperaturze, w trakcie której także część szczepów staje się hydrofobowa. Można zatem przyjąć, że w przypadku, gdy w środowisku chłodni, w której znajdują się szczepy listerii posiadające zdolność stawania się hydrofobowymi to rozwijając się na powierzchni tusz będą stawały się hydrofobowymi. Podobne wyniki uzyskali Braindet i wsp. Stwierdzili oni iż przesiewając wielokrotnie *Listeria monocytogenes* z podłoża na podłoże

i utrzymując hodowlę w 4°C wraz z kolejnym posiewem wzrasta hydrofobowość szczepów. Nie odnosiło się to jednak do wszystkich szczepów. Ponadto stwierdzili, że w trakcie hodowli na podłożu o pH 6,0 wzrasta hydrofobowość szczepów (Briandet i wsp. 1999).

Bardzo ważnym okazał się także skład pożywki. Najwięcej szczepów hydrofilowych stwierdzono hodując listerie na agarze cukrowym. O wpływie cukrów prostych na własności *Listeria monocytogenes* szczepu ScottA donosili także Braindett i inni (1999). Stwierdzili oni, że dodatek glukozy bądź kwasu mlekowego w do podłoża BHI albo TSYE i stosowanie temperatury inkubacji 37°C wpływał na hydrofobowość, ładunek (ujemny) oraz zdolność akceptacji elektronów przez listerie. Komórki były hydrofilne tylko, gdy rosły w pH obojętnym. Van Loosdrecht i wsp. (1987) stwierdził, że powierzchnie typowo biologiczne, jak i stałe podłoża w środowisku wodnym mają zwykle także ładunek ujemny, co potwierdzałoby fakt tak dużej ilości szczepów hydrofilowych hodowanych na podłożu z agarem cukrowym.

Obniżenie pH powodowało zmniejszenie elektroujemności komórek. Zmiany te zależą od obecności grup fosforowych wiązań diestrowych $R-O-HPO_2-O-R/RE-O-PO_2-O-R$ kwasów tejchojowych ściany komórkowej (Briandet i wsp. 1999). Odmienność naszych badań i wyników cytowanej powyżej pracy spowodowane były prawdopodobnie użyciem innych szczepów oraz innego podłoża hodowlanego. W odróżnieniu od cukrów białka środowiskowe, jak żelatyna, nie redukują hydrofobowości (Barriaga i wsp., 1996).

Bardzo istotnym były także warunki próżniowe. Hodując w nich listerie bez względu na szczep oraz podłożo hodowlane listerie zawsze stawały się hydrofilowe. Istotnym podkreślenia w tym miejscu jest to, że w piśmiennictwie nie zanotowano wcześniej takiego zjawiska. Fenomen ten może być jedną z możliwości wytłumaczenia niskiej patogenności szczepów wyizolowanych z żywności przy założeniu, że jedynie formy hydrofobowe danego szczepu są chorobotwórcze. Ponieważ przechowywanie żywności (wędlin, ryb wędzonych) jest powszechnie stosowane a listerie mogą się rozwijać w tych warunkach to pomimo namnażania będąc formami hydrofilowymi są znacznie mniej niebezpieczne dla konsumenta.

W pracy zastosowano także metodę MATH do badania adhezji listerii do oleju roślinnego - oleju z oliwek. Olej roślinny jest mieszaniną estrów glicerolu

i niewielkiej ilości wolnych nienasyconych kwasów tłuszczowych a więc powinien mieć charakter hydrofobowy. Wykonane badania dały zaskakujące rezultaty. Stwierdzono, że listerie nie adherują do tego tłuszczu. Po wytrząsaniu przez 60 sekund szczepów hodowanych w warunkach w których część z nich była średnio i mocno hydrofobowa w stosunku do heksadekanu nie stwierdzono zmian gęstości optycznej. Giovanacci i inni stwierdzili stosując różne związki hydrofobowe jak dekan, heksadekan, octan etylu czy chloroform, że listerie adherują do nich w bardzo różnym stopniu (Giovanacci i wsp., 2000). W żadnym jednak przypadku nie obserwowali kompletnego braku adherencji. Obserwowane zjawisko wskazuje, że procesy zachodzące w trakcie adhezji bakterii do substancji hydrofobowych są znacznie bardziej skomplikowane niżeli proste łączenie się ze sobą substancji hydrofobowych. We wstępnej fazie pracy zakładano, że szczepy namnażające się w warunkach niekorzystnych, jakie występują w przetwórstwie i przechowywalnictwie żywności stają się hydrofobowe, co ułatwia im dalej zanieczyszczanie produktów wędliniarskich które zawsze są w większym lub mniejszym stopniu pokryte warstewką tłuszczu. Wykonane proste doświadczenie wykazuje, że film tłuszczowy jest raczej pozytywnym elementem zapobiegającym zanieczyszczaniu produktów listeriami.

Podsumowując omówiony etap badań można stwierdzić, że szczepy *Listeria monocytogenes* są, biorąc pod uwagę hydrofobowość bardzo heterogenną grupą drobnoustrojów. Są wśród nich szczepy hydrofilowe oraz takie, które w zmienionych warunkach stają się hydrofobowymi. Stąd nie można o nich jednoznacznie powiedzieć, że są to bakterie hydrofilowe. Zdanie to jest tym bardziej zasadne, że badacze zajmujący się tą problematyką nie ustalili arbitralnie warunków oraz metody według której będzie się badało tę cechę. Ponadto ulega ona bardzo dużym zmianom w zależności od warunków środowiskowych. Obniżając pH, temperaturę hodowli bakterie te stają się hydrofobowe, natomiast hodując je w warunkach próżniowych są hydrofilowe. Nie adherują one także do oleju roślinnego. Powyższe tezy oraz obserwacje mają wiele cech nowości ponieważ brak jest analogicznych doniesień w światowym piśmiennictwie.

Pierwszym etapem zanieczyszczania mięsa i środowisk przetwórci drobnoustrojami jest proces adhezji. Najczęściej analizuje się to zjawisko

w odniesieniu do powierzchni, które są stosowane w środowiskach przetwórci jak stal nierdzewna, guma czy plastiki (Mafu i wsp., 1991, Linton i wsp., 1999, Cunliffe i wsp., 1999, Carpentier i wsp., 2000, Vatanyoopaisarn i wsp., 2000, Beresford i wsp., 2001, Norwood i wsp. 1999). Bardzo intensywnie było także badane przyleganie bakterii do powierzchni mięsa (Firstenberg-Eden 1981, Dikson, Koohmaraie, 1989, Rodrigou-Szulc i wsp., 1996). Pomimo to dokładny mechanizm adhezji nadal nie jest w pełni zrozumiały. Duża część bakterii, bez względu na rodzaj, jest tylko bardzo luźno związana z powierzchnią mięsa i może być łatwo usuwana przez zmywanie. Początkowa interakcja bakterii z powierzchnią mięsa zachodzi poprzez odwracalne elektrostatyczne interakcje związane z siłami van der Waals'a (Mafu i wsp., 1991). Silniejsze wiązanie bakterii do tusz może być ułatwione przez egzopolisacharyd - glikokaliks otaczający komórki (Barriga i wsp., 1996, Bennedict i wsp., 1991). Uważa się, że kolagen typu I, obecny w mięśniach i tkance łącznej jest główną strukturą, do której adherują salmonelle (Bennedict i wsp., 1991). W adhezji bakterii do mięsa duże znaczenie ma hydrofobowość drobnoustrojów (Martin i wsp., 1997). Zmiany struktury tkanek powierzchni tusz zachodzące w trakcie oparzania parą wodną nie wpływają na adhezję bakterii (Wariiner i wsp., 2001). Znacznie mniej prac dotyczy adhezji do osłonek używanych w przemyśle wędliniarskim. Dotyczą one przede wszystkim osłonek sporządzonych z kolagenu. Barriga stwierdził, że ilość adherujących salmonelli zależy od czasu i koncentracji inoculum (Barriga i wsp., 1996). Autorzy sugerują przy tym że osłonki kolagenowe są dobrym modelem badania adhezji bakterii do mięsa (Walls i wsp., 1993).

W niniejszej pracy porównywano adhezję szczepów *Listeria monocytogenes* do osłonek naturalnych oraz sztucznych: kolagenowych, celulozowych oraz sporządzonych z poliamidu. Używane szczepy *Listeria monocytogenes* należały do serotypu 1/2a i 4b. Zastosowano cztery różne koncentracje inoculum bakterii od 10^3 do 10^6 JKT/ml, zakładając różny stopień adherencji listerii do poszczególnych rodzajów osłonek. W przypadku szczepu LM-1577 stwierdzono, że najwięcej komórek adherowało do osłonek naturalnych oraz statystycznie mniej do osłonek z kolagenu. W odniesieniu do osłonek z celulozy i poliamidu adhezja listerii była bardzo niska i stwierdzono jedynie pojedyncze kolonie przy najwyższym inoculum - 10^6 JKT/ml. Bardzo podobne wyniki stwierdzono w przypadku szczepu środowiskowego 1-IV. Także i w tym przypadku stwierdzono najintensywniejszą adherencję do osłonek naturalnych, znacznie niższą do kolagenowych i śladową do

celulozowych i poliamidowych. Wyniki te wykazują, że w trakcie produkcji zanieczyszczeniem listeriami ulegają osłonki wykonane z naturalnych produktów zwierzęcych, jak kolagen czy jelito, natomiast struktura powierzchni osłonek celulozowych i poliamidowych utrudnia zagnieżdżanie się bakterii. Uzyskane wyniki znajdują potwierdzenie w pracy Chavant i wsp. (2002). Autorzy ci badali zdolność adhezji listerii do powierzchni hydrofilowych (stal nierdzewna) i PTFE (politetrafluoroetylen). Stwierdzili, że stopień adhezji bakterii do powierzchni był podobny, gdy doświadczenie prowadzono w temp. 20°C i 37°C. Natomiast w temperaturze 8°C bakterie tworzyły biofilmy, na powierzchniach stalowych zaś nie obserwowano wzrostu na powierzchni hydrofobowej. Doświadczenie to zdaje się tłumaczyć rozbieżności pomiędzy adhezją a hydrofobowością. Li i wsp. stwierdzili brak korelacji pomiędzy hydrofobowością *E.coli* O157:H7 a zdolnością adhezji do mięśni wołowych (Li i wsp., 1999) Podobny wynik uzyskali Craven i wsp. w badaniach adhezji *Salmonella typhimurium* do śluzówki jelit kurzych (Craven i wsp., 1998). Zupełnie przeciwne natomiast rezultaty uzyskali van Loosdrecht i wsp (1987). Korelacje te zależą od metodyki badania hydrofobowości (Marin i wsp., 1997).

Jak wiadomo, listerie posiadają zdolność rozmnażania się w warunkach próżniowych, a takie warunki są często stosowane do przechowywania produktów mięsnych. Sugeruje się, że szczepy listerii hodowane w warunkach próżniowych stają się wybitnie hydrofilowe (Dąbrowski i wsp. 2001), zaś Martin stwierdził korelację pomiędzy hydrofobowością bakterii kwasomlekowych, a ich adhezyjnością do tkanki mięsnej (Martin i wsp. 1997). Taką zdolność stawania się wybitnie hydrofilowymi miały także szczepy użyte w niniejszych doświadczeniach. W związku z tym w dalszej części doświadczeń hodowlę listerii prowadzono w warunkach próżniowych po czym analizowano proces adhezji. Stwierdzono, że w przypadku obu szczepów 1-IV i LM-1577 warunki próżniowe w znacznym stopniu obniżają ich adhezję do osłonek naturalnych i kolagenowych. Może to sugerować znaczenie wiązań hydrofobowych w procesie adhezji listerii do osłonek. W przypadku osłonek naturalnych stwierdzono obniżenie o połowę ilości wyrosłych drobnoustrojów. Natomiast w przypadku osłonek kolagenowych warunki próżniowe prawie kompletnie zahamowały adhezję listerii do osłonek. Tego faktu nie można było stwierdzić w odniesieniu do osłonek celulozowych i poliamidowych, ponieważ już w warunkach tlenowych adherowało do nich bardzo niewiele komórek.

Kwasy tłuszczowe są naturalnie występującym antybakteryjnym czynnikiem wykazującym brak toksyczności dla ludzi. Ponadto związki te hamują wzrost bakteryjnych patogenów i drobnoustrojów zepsucia.

Jak wiadomo tłuszcze mają własności hydrofobowe. W związku z powyższym w dalszej części testowano wpływ filmu tłuszczowego na proces adhezji listerii. Zakładano, że zmiana powierzchni osłonki na hydrofobową zwiększy ilość adherujących komórek. Osłonki były powlekane filmem w temperaturze 60°C w przypadku tłuszczu stałego zaś w przypadku olejów płynnych (olej z oliwek o niskiej kwasowości, olej z oliwek - mieszanina nienasyconych kwasów tłuszczowych) na zimno. Czas powlekania ustalono na 10 minut. Do tego etapu doświadczenia wybrano szczep 1-IV ze względu na to, że został on wyizolowany ze środowiska przemysłu mięsnego. Jak wykazano powleczenie osłonek tłuszczem dało odwrotny efekt – zmniejszenie liczby adherujących bakterii. Zaobserwowany fakt potwierdza celowość dawniej stosowanych w Polsce, w warunkach wiejskich praktyk smarowania tłuszczem przechowywanych kiełbas, co miało je chronić przed pleśnieniem. W przypadku osłonek powleczonych tłuszczem stałym, redukcja ta była bardzo niewielka w odniesieniu do osłonek naturalnych, zaś bardzo znaczna w osłonkach kolagenowych. Podobną sytuację zaobserwowano w osłonkach powleczonych oliwą z oliwek, przy czym najintensywniejsza redukcja wystąpiła w osłonkach pokrytych w mieszaninie kwasów tłuszczowych. Wynik ten można tłumaczyć tym, że kwasy tłuszczowe mają własności antybakteryjne zarówno w stosunku do flory zepsucia jak i patogenów człowieka (Ababouch i wsp., 1992, McKellar i wsp., 1992, Ouattamara i wsp., 1997, Hinton i wsp., 2000). Kwas olejowy redukuje liczebność populacji bakteryjnej flory na powierzchni skóry drobiu. Redukcja ta dotyczy ogólnej liczby tlenowych bakterii, drobnoustrojów z rodzaju *Enterobacteriaceae*, *Campylobacter* oraz *Listeria*, oraz enterococów, przy czym ten ostatni drobnoustrój jest szczególnie wrażliwy na niskie koncentracje kwasu podczas gdy *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus lentus* i *Salmonella typhimurium* są stosunkowo odporne (Hinton i wsp., 2000). O hamowaniu wzrostu *L. monocytogenes* przez kwasy tłuszczowe i monoglicerydy donosił także Wang (1992). Znaczenia antybakteryjnego działania kwasów tłuszczowych na listerie nie należy przeceniać. Wykazano bowiem, że listerie zawieszane w emulsji olejowo wodnej sporządzonej z oleju słonecznikowego rozwijają się w mikrokroplach oleju postaci kolonii (Brocklehurst i wsp., 1995, Parker i wsp., 1995). Należy raczej przyjąć, że ochronne

działanie tłuszczów wynika z zablokowania procesu adhezji, co potwierdzają badania hydrofobowości listerii względem oleju roślinnego. Innym czynnikiem hamującym przyleganie bakterii z grupy *Lactobacillus* do osłonek kolagenowych są białka. Barriaga i wsp. (1996), posługując się szczepami z rodzaju *Lactobacillus* zanotowali takie działanie w odniesieniu do albuminy surowicy wołowej oraz mannoprotein ściany komórkowej drożdży. Z kolei Barnes i wsp. (1999) stwierdzili, że białka mleka: α -kazeina, β -kazeina, κ -kazeina i α -laktoalbumina hamują adhezję listerii do powierzchni stalowych.

Benito i wsp. badali hydrofobowość (określaną czterema metodami) bakterii *Listeria monocytogenes*, *Bronchotrix thermoseptica*, *Escherichia coli*, *Moraxiella osloensis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Yersinia enterocolitica*, oraz *Clostridium perfringens* oraz ich zdolność do adhezji do powierzchni wołowiny. Stwierdzono wysoką zależność pomiędzy hydrofobowością a adhezją do mięsa dla *Bronhotrix*, *Yersinia*, *Clostridium* i *Staphylococcus* (Benito i wsp., 1997).

Bouttier i wsp. badali przylegania *Salmonella choleraesuis* subspecies *choleraesuis* do mięśni i tkanki tłuszczowej wołowiny. Stwierdzili, że salmonelle adherowały dobrze do tkanek mięśniowych. Bakteria miała bardzo hydrofilową powierzchnię. Za przyleganie salmonelli do mięśni i tłuszczu nie były odpowiedzialne ładunek ani hydrofobowość a rzęski ponieważ ich usunięcie hamowało adhezję (Bouttier i wsp., 1997).

Dickson i wsp. określali zależność ładunku powierzchniowego, hydrofobowości bakterii i zdolności do przylegania do mięsa i tłuszczu. Stwierdzili, że w porównaniu ze szczepami *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella* i *Staphylococcus*, *Listeria monocytogenes* należy do szczepów stosunkowo najmniej hydrofobowych. *Listeria* posiadała także stosunkowo niską zdolność do adhezji do tkanek chudych a podwyższoną do tkanek tłustych. Korelację pomiędzy hydrofobowością a adhezją do tkanek tłustych stwierdzono tylko dla *Staphylococcus aureus* zaś korelacje pomiędzy ujemnym ładunkiem a przyleganiem do chudych mięsnych powierzchni stwierdzono tylko dla *Streptococcus epidermitis* (Dickson i wsp., 1989).

O wpływie temperatury wzrostu na adhezję do heksadekanu donosili Govannacci i wsp. Stwierdzili oni, że wraz ze spadkiem temperatury hodowli wzrasta hydrofobowość pięciu szczepów listerii. Ze spadkiem temperatury hodowli spada także elektroforetyczna ruchliwość co świadczy o tym, że zmniejsza się ich ładunek

ujemny. Nie dotyczyło to jednak wszystkich badanych pięciu szczepów w równym stopniu. (Giovannacci i wsp., 2000).

Istnieje zależność pomiędzy adhezją spor *Bacillus cereus* do komórek nabłonkowych, powierzchnią hydrofobowością i wirulencją szczepu (Andersson i wsp., 1998).

Za adhezję *Listeria monocytogenes* odpowiedzialny jest ładunek ujemny powierzchni listerii. Im większy ładunek ujemny tym większa adhezja (Dicson i wsp., 1994).

Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, że adhezyjność listerii do osłonek kiełbas uzależniona jest od rodzaju osłonki. Tak często stosowane do wyrobów masarskich osłonki sztuczne są złym podłożem dla adhezji i dalszego rozwoju listerii. Ponadto proces ten ograniczają warunki próżniowe powszechnie stosowane w przechowywaniu żywności, oraz środowisko tłuszczów wszechobecne w przetwórnictwie przemysłu mięsnego. Jednocześnie wynik adhezji zależy także od właściwości danego szczepu.

W ostatniej części pracy badano patogenność *Listeria monocytogenes* dla myszy. Najczęściej proces ten analizowany jest w aspekcie zjawisk zachodzących w komórce zakażonej tą bakterią (Boland-Vázquez i wsp., 2001). Znacznie mniej uwagi zwraca się na początkowe etapy zakażenia jakie zachodzą po wniknięciu patogenu do przewodu pokarmowego. Stwierdzono, że kwasowość żołądka oraz zdolność adaptacji do kwaśnych warunków jest jednym z ważniejszych elementów zakaźności *L. monocytogenes* dla myszy (Saklani-Jusforgues i wsp., 2000). Ponadto zastosowanie leków obniżających kwasowość żołądka jest czynnikiem predysponującym rozwój schorzenia u ludzi. Warunki wzrostu listerii na powierzchni hydrofobowej są zupełnie inne, niż gdy mamy do czynienia z komórkami wolno pływającymi. Po przyłączeniu się do powierzchni listerie dzięki obecności genów *relA* i *hpt* zaczynają akumulować (p)ppGpp - guanozypentafosforan. Mutanty pozbawione wymienionych genów są niepatogenne. Wskazuje to, że obok grupy genów leżących w wyspach patogenności listerii (*mpl*, *actA*, *plcA*, *plcB*, *hly*, *pfr*) (Boland-Vázquez i wsp., 2001) w zakażeniu mają udział także geny odgrywające rolę w przyleganiu do powierzchni (Taylor i wsp., 2002). Jednym z podstawowych czynników regulacji cech fenotypowych, w tym i patogenności listerii jest temperatura. Także ruchliwość listerii jest modulowana przez temperaturę. Geny

kodujące listeriozynę O i inne czynniki wirulencji są transkrybowane w 37^o C ale nie w 22^oC. Szczepy pozbawione genów *cheY* i *cheA* odpowiedzialnych za chemotaksję poprzez inercyjną inaktywację operonu *cheYA* tracą zdolność do przylegania do mysich fibroblastów (Flanary i wsp., 1999). Wskazuje to dodatkowo, że procesy warunkujące rozwój zakażenia są warunkowane nie tylko genami wyspy patogenności. Dowodzi tego także praca Santiago i wsp., którzy stwierdzili, że ekspresja powierzchniowego białka LAP o ciężarze 104-kDa odpowiedzialnego za adhezję do ludzkich komórek Caco-2 jest uzależniona od warunków hodowli. Znaczna ilość tego białka występowała po hodowli w 37^oC i 42^oC oraz w czasie stacjonarnej fazy wzrostu. Obniżenie temperatury hodowli znacznie zmniejszyło ekspresję tego białka. (Santiago i wsp., 1999).

Marco i wsp. (1997) badali rozwój zakażenia u myszy po podaniu *Listeria monocytogenes per os*. Stwierdzili, że po podaniu dawki 10⁹ komórek po 6 godzinach bakterie są wykrywane w węzłach chłonnych jamy brzusznej. W śledzionie i wątrobie pojawiają się one po 24 godzinach. W ścianie jelita powstają zmiany w kępkach Peyera i występują tam ropne reakcje zapalne z naciekami granulocytarnymi. Duże zmiany zapalne obserwowane były także w węzłach chłonnych jamy brzusznej. Potwierdza to praca Prona i wsp. (1998), którzy sugerują, że kępki Peyera są miejscem namnażania się listerii.

Zdolności zakaźne listerii, podobnie jak ich inne cechy są modyfikowane przez warunki środowiskowe. Dotyczy to listeriozyny, której produkcja była zahamowana u szczepów hodowanych w niskich temperaturach (Myers i wsp., 1994). Tłumacząc różnice w patogenności szczepów listerii autorzy raczej skłaniają się do hipotezy, według której ekspresja genów wirulencji kontrolowanych przez *prfA* gen jest regulowana przez dostępne w środowisku źródła węgla. Huilet i wsp. (1999) stwierdzili, że ekspresja genu *hly* jest regulowana przez występującą w środowisku celobiozę. Podobne działanie wykazują β glukozydy (Brehm i wsp., 1999), oraz produkty reakcji Maillarda (Sheikh-Zeinoddin i wsp., 2000). Nie wyklucza się także, że inne niż *prfA* bakteryjne czynniki oraz reakcja żywiciela modulują ekspresję *prfA* regulonu (Vazquez-Boland i wsp., 2001).

Podstawową przesłanką, która przyczyniła się do podjęcia badań nad zakaźnością listerii były dane dotyczące dawek zakaźnych salmonelli. Dawki te są bardzo różne od 10¹ do 10¹¹ JTK/g. Tak duże zróżnicowanie dawek zakaźnych spowodowane jest różnicami w koncentracji tłuszczu. (D'Aoust i wsp., 1994)

w pożywieniu, które było przyczyną zakażenia. Sugeruje się, że w środowisku tłuszczowym podczas przeżuwania pokarmu, hydrofobowe salmonelle lokują się wewnątrz powstających micelli tłuszczowych co stwarza warstwę ochronną przed działaniem kwasów żołądkowych (Blaser i wsp., 1982).

Powyższa hipoteza w odniesieniu do *L. monocytogenes* miała szansę okazać się być prawdziwą ponieważ szereg szczepów badanych, a szczególnie wzorcowy LM-1577 łatwo stają się hydrofobowe. Przyjęto zatem, że podobnie jak w przypadku salmonelli, szczep hydrofobowy podawany myszom w tłuszczowym środowisku może być chroniony przed działaniem kwasu solnego żołądka przez micelle tłuszczowe. W związku z tym do badań użyto szczepy izolowane z produktów mięsnych: 2-XVI, który był szczególnie hydrofilowy oraz 1-IV łatwo przekształcający się w hydrofobowy. Szczepy te hodowano w warunkach zapewniającym im hydrofobowość - warunki tlenowe i hydrofilowość - warunki beztlenowe. Celem potwierdzenia wpływu środowiska tłuszczowego listerie podawano *per os* myszom jako zawiesinę wodną albo emulsję tłuszczowo-wodną. Uzyskane wyniki nie potwierdziły przyjętej hipotezy. W przypadku obu szczepów hydrofilowego i hydrofobowego podanych w emulsji olejowo wodnej liczba JTK wyizolowanych z wątrób i śledzion była niższa niżeli po podaniu zawiesiny wodnej. Szczególnie niskie wartości uzyskano po podaniu emulsji z oboma szczepami hodowanymi w warunkach próżniowych. Powyższe dane wskazują, że olej wywiera negatywne działanie prawdopodobnie poprzez bakteriostatyczne działanie kwasów tłuszczowych. Natomiast, być może hodowla w warunkach próżniowych wybitnie uczuła listerie na działanie tych kwasów. W następstwie tego uszkodzone bakterie są szybko eliminowane z jelit (Barbour i wsp., 2001).

Nie uzyskano także istotnych różnic w zakaźności szczepów; hydrofilowego i hydrofobowego wyrażonej w ilości jednostek tworzących kolonie wyizolowanych z wątrób i śledzion. Wniosek ten wymaga jednak potwierdzenia na większej liczbie szczepów. Trudnym natomiast do wytłumaczenia jest fakt niższych ilości w jelitach listerii hydrofobowych - szczep 1-IV w porównaniu z hydrofilowym - szczep 2-XVI. Może to sugerować, że szczep 1-IV jest intensywniej absorbowany do jelit co w pewnym przypadku potwierdzało by znaczenie hydrofobowości dla zjawiska adsorpcji listerii do powierzchni jelit. Wyniki te nie są jednak potwierdzane odpowiednio wyższymi wartościami ognisk zapalnych w śledzionach i wątrobach. Jak wiadomo, pomiędzy ścianą jelita a wątrobą i śledzioną istnieje szereg przeszkód

zarówno mechanicznych jak i immunologicznych. Jedną z najpoważniejszych są węzły chłonne otrzewnowej. Nie jest wykluczonym, że pomimo lepszej adsorpcji do ściany jelita, większość bakterii szczepu 1-IV, być może ze względu na niższą patogenność jest wychwytywana w otrzewnowych węzłach chłonnych. Jest to jedno z możliwych wytłumaczeń powyższego zjawiska. Wyniki badań jelit potwierdzają wcześniej postawioną hipotezę, że hodowla listerii w próżni uczyła je na późniejsze działanie kwasów tłuszczowych. W przypadku obu bowiem szczepów stwierdzono bardzo niski poziom ilości w jelitach.

Powyższe dane wskazują, że warunki przechowalnicze - pakowanie próżniowe oraz środowisko tłuszczowe jakim są wyroby mleczne (sery miękkie, twarogi) ryby wędzone, oraz wędliny są elementem ochronnym przed zakażeniem listeriami. Poparciem tezy o ochronnym działaniu tłuszczu na zakażenia listeriami okazała się praca Spronga i wsp. (1999). Autorzy ci badali wpływ diety tłuszczowej na zakażenie szczurów *Listeria monocytogenes* i *Salmonella enteritidis*. Stwierdzili, że dieta tłuszczowa chroniła szczury przed zakażeniem, zaś nie działała na salmonelle. Może być to zatem ważną przyczyną, która powoduje, że pomimo częstego występowania *Listeria monocytogenes* w wymienionych powyżej rodzajach żywności, do zakażeń dochodzi stosunkowo rzadko. Wartym jest także nadmienienia, że w piśmiennictwie nie napotkano na podobne doświadczenia stąd wysunięta teza ma duży element nowości.

6. WNIOSKI

1. Szczepy *Listeria monocytogenes* hodowane w środowisku tlenowym w 30°C, czyli w optymalnych warunkach, wykazują własności hydrofilowe.
2. Zmiana warunków hodowli jak: temperatura, pH, skład podłoża, dodatek do podłoża NaCl powoduje przekształcanie się szczepów *Listeria monocytogenes* z hydrofilowych w hydrofobowe.
3. Szczepy *Listeria monocytogenes* są bardzo zróżnicowaną populacją w aspekcie ich zdolności do przekształcania się w formy hydrofobowe.
4. W warunkach beztlenowych listerie przekształcają się w formy wysoce hydrofilowe.
5. Szczepy *Listeria monocytogenes* nie adherują do oleju z oliwek.
6. Na adhezję *Listeria monocytogenes* do osłonek kielbas ma wpływ: temperatura hodowli, temperatura, w której zachodzi to zjawisko, oraz czas inkubacji.
7. Komórki *Listeria monocytogenes* lepiej adherują osłonek naturalnych (jelita i kolagen) niż do osłonek z materiałów syntetycznych (celuloza, poliamid).
8. Powlekanie osłonek filmem tłuszczowym zmniejsza adhezję *Listeria monocytogenes* do osłonek naturalnych. Spadek ilości adherujących komórek zależy od rodzaju zastosowanego tłuszczu,
9. Zwiększenie ilości wiązań nienasyconych w tłuszczu obniża adhezję drobnoustrojów do osłonek.
10. Hodowla *Listeria monocytogenes* w warunkach beztlenowych powoduje obniżenie ilości adherujących drobnoustrojów do osłonek.
11. Emulsja olejowo-wodna oraz próżniowe warunki hodowli w istotnym stopniu redukują ilość komórek *Listeria monocytogenes* w mysich śledzionach i wątrobach.
12. Brak jest istotnych różnic w zakaźności szczepów hydrofilowego i hydrofobowego.

7. PIŚMIENICTWO

1. Ababouch L., Chaibi A., Busta F.F., 2001: Inhibition of bacterial spore growth by fatty acids and their sodium salts. *J. Food Prot.* 55. 980-984.
2. Absolom D.R., Lamberti F.V., Policova Z., Zingg W., Van Oss C.J., Neumann A.W., 1983: Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*, 46. 90-97.
3. Ahmed K., Nakagwa T., Nakano Y., Martinez G., Ichinose A., Zheng C.H., Akaki M., Aikawa M., Nagatake T., 2000: Attachment of *Moraxella catarrhalis* occurs to the positively charged domains of pharyngeal cells. *Microb. Pathog.* 28. 203-209.
4. Al-Makhalafi H., McGuire J., Daeschel M., 1994: Influence of preadsorbed milk proteins on adhesion of *Listeria monocytogenes* to hydrophobic and hydrophilic silica surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. 60. 3560-3565.
5. Al-Makhalafi H., Nasir A., McGuire J., Daeschel M., 1995: Adhesion of *Listeria monocytogenes* to silica surfaces after sequential and competitive adsorption of bovine serum albumin and beta-lacto globulin, *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5). 2013-2015.
6. Andersson A., Granum P.E., Ronner U., 1998: The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism: *Int. J. Food Microbiol.* 39. 93-99.
7. Annou B.A., Becker L.A., Bayles D.O., Labeda D.P., Wilkinson B.J., 1997: Critical role of ateneiso-C_{15:0} fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3887-3894.
8. Archer D.L., 1990: *Listeria monocytogenes*: what is its ecological niche? W "Foodborne listeriosis" A.L. Miller i wsp., ELSEVIER. Amsterdam. 2. 5-8.
9. Avery S.M., Buncic S., 1997: Differences in pathogenicity for chick embryos and growth kinetics at 37°C between clinical and meat isolates of *Listeria monocytogenes* previously stored at 4°C. *International Journal of Food Microbiology*. 34(3). 319-327.
10. Barbour A.H., Rampling A., Hormaeche C.E., 1996: Comparison of the infectivity of *Listeria monocytogenes* following intragastric and intravenous inoculation in mice. *Microbial Pathogenesis*. 20. 247-253.
11. Barbour A.H., Rampling A., Hormaeche C.E., 2001: Variation in the infectivity of *Listeria monocytogenes* Isolates following intragastric inoculation of mice. *Infection and Immunity*. 69 (7). 4657-4660.
12. Barnes L.M., Lo M.F., Adams M.R., Chamberlain A.H.L., 1999: Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (10). 4543-4548.
13. Barriga M.I., Piette J.P.G., 1996: Reduction of adhesion of *Lactobacillus sp.* to collagen sausage casing by proteins. W "Foodborne listeriosis" A.L. Miller i wsp., ELSEVIER. 29 (3-4). 249-257.

14. Bayles D. O., Annous B. A., Wilkinson B. J. 1996.: Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in response to temperature downshock and growth at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*. 62. 1116-1119.
15. Belebona M.C., Morinigo M.A., Borrego J.J., 2001: Hydrophobicity and adhesion to fish cells and mucus of *Vibrio* strains isolated from infected fish. *Int. Microbiol.* 4. 21-26.
16. Bell C., Kyriakides A. 1998: *Listeria*. A practical approach to the organism and its control in foods. Blackie Academic & Professional. ITP. London. 1. 1-9.
17. Bell C., Kyriakides A. 1998: *Listeria*. A practical approach to the organism and its control in foods. Blackie Academic & Professional. ITP. London. 2. 10-29.
18. Benedict R.C., 1990 : *Listeria monocytogenes*: physiology and metabolism. W "Foodborne listeriosis" A.L. Miller i wsp. ELSAVIER. 4. 13-24.
19. Benito Y., Pin C., Martin M.L., Garcia M.L., Selgas M.D., Casas C., 1997: Cell surface hydrophobicity and attachment of pathogenic and spoilage bacteria to meat surfaces. *J. Meat Science*. 45 (4). 419-425.
20. Benedict R.C., Schultz ., Jones S.B., 1992: Attachment and removal of *Salmonella spp.* on meat and poultry tissues. *J. Food Prot.* 11. 135-148
21. Beresford M.R., Andrew P.W., Shama G., 2001: *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. *Journal of Applied Microbiology*. 90. 1000-1005.
22. Berg, D.E., Akopyantz, N.S. and Kersulyte, D., 1994: Fingerprinting microbial genomes using the RAPD or AP-PCR method. *Meth. Mol. Cell Biol.* 5. 174-185.
23. Betakova T., Wolffe E.J., Moss B., 2000: The vaccinia virus A14.5L gene encodes a hydrophobic 53-amino-acid virion membrane protein that enhances virulence in mice and is conserved among vertebrate poxviruses. *J. Virol.* 74. 4085-4092.
24. Bille J., 1990: Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. W "Foodborne listeriosis" A.L. Miller i wsp. ELSAVIER. 12. 71-79.
25. Blaser M.J., Newman L.S., 1982: A review of human salmonellosis. Infective dose. *Rev. Infect. Dis.* 4. 1096-1106.
26. Boerlin P., Boerlin-Petzold F., Bannerman J.B., Jemmi T. 1997: Typing *Listeria monocytogenes* isolates from fish products and human listeriosis cases. *Applied and Environmental Microbiology*. 63. 1338-1343.
27. Bouttier S., Linxe C., Ntsama C., Morgant G., Bellon-Fontaine M.N., Fourniat J., 1997: Attachment of *Salmonella choleraesuis choleraesuis* to beef muscle and adipose tissues. *Journal of Food Protection*. 60 (1). 16-22.
28. Braun L., Ohocyon H., Cossart P., 1998: The InlB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. *Mol. Microbiology* . 27. 1077-1087.
29. Brehm K., Ripo M-T., Kreft J., Vázquez-Boland J-A., 1999: The *bvr* locus of *Listeria monocytogenes* mediates virulence gene repression by β -glucosides. *Journal of Bacteriology*. 181(16). 5024-5032.
30. Brett M.S., Short P., McLauchlin J. 1998. A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels. *Int. J. Food Microbiol.* 43. 223-229.

31. Briandet R., Leriche V., Carpentier B., Bellon-Fontaine M.N., 1999: Effects of growth procedure on the surface hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* cells and their adhesion to stainless steel. *Journal of Food Protection*. 62 (9). 994-998.
32. Briandet R., Meylheue T., Maher C., Bellon-Fontaine M.N., 1999: *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristic under different environmental growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (12). 5328-5333.
33. Brocklehurst T.F., Parker M.L., Gunning P.A., Coleman H.P., Robins M.M., 1995: Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: II—Effect of emulsion structure on growth parameters and form of growth. *J. Appl. Bacteriol.* 78(6). 609-615.
34. Brosh R., Catimel B., Milon G., Buchrieser C., Vindel E., Rocourt J., 1993: Virulence heterogeneity of *Listeria monocytogenes* strains from various sources (food, human, animal) in immunocompetent mice and its association with typing characteristic. *Journal of Food Protection*. 56(4). 296-301.
35. Bruinsma G.M., Van der Mei H.C., Busscher H.J., 2001: Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. *Biomaterials*. 22. 3217-3224.
36. Burke D.A., Axon A.T., 1988: Hydrophobic adhesion of *E.coli* in ulcerative colitis. *Gut*. 29. 41-43.
37. Busscher H.J., Weerkamp A.H., Van der Mei H.C., Van Pelt A.W.J., De Jong H.P., Arends J., 1984: Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*. 48. 980-983.
38. Butler J.L., Stewart J.C., Vanderzant C., Carpenter Z.L., Smith G.C., 1979: Attachment of microorganisms to pork skin and surfaces of beef and lamb carcasses. *J. Food. Prot.* 42. 401-406.
39. Chasseignaux E., Toquin M.T., Ragimbeau C., Salvat G., Colin P., Ermel G. 2001. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from the environment, raw meat and raw products in two poultry- and pork-processing plants. *J. Appl. Microbiol.* 91. 888-899.
40. Chavant P., Martinie B., Meylheuc T., Bellon-Fontaine M.-N., Hebraud M., 2002: *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (2). 728-737.
41. Chodorowska M., Kuklińska D., 2002: Czynniki wirulencji *Listeria monocytogenes* oraz patogenez, obraz kliniczny i antybiotykoterapia listeriozy. *Postępy Mikrobiologii*. 41(1). 37-49.
42. Colburn K.G., Kaysner C.A., Abeyta C. JR., Wekell M.M. 1990:*Listeria* species in California Coast Estuarine Environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 56. 2007-2011.
43. Conte M.P., Longhi C., Polidoro M., Petrone G., Buonfiglio V., Di Santo S., Papi E., Seganti L., Visca P., Valenti P., 1996: Iron availability affects entry of *Listeria monocytogenes* into the enterocytelike cell line Caco-2. *Infect Immun.* 64(9).3925-3929.

44. Craven S.E., Williams D.D., 1998: In vitro attachment of *Salmonella typhimurium* to chicken cecal mucus: effect of cations and pretreatment with *Lactobacillus spp.* isolated from the intestinal tracts of chickens. *Journal of Food Protection*. 61. (3). 265-271.
45. Cunliffe D., Smart C.A., Alexander C., Vulfson E.N., 1999: Bacterial adhesion at synthetic surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(11). 4995-5002.
46. Czuprynski C.J., Faith N.G., Steinberg H., 2002: Ability of the *Listeria monocytogenes* strain ScottA to cause systemic infection in mice infected by the intragastric route. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (6). 2983-2990.
47. Dąbrowki W., Czeszejko K., Bogusławska-Wąs E., Mędrala D., 2001: The growth of *Listeria monocytogenes* in raw-meat sausages. *Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis*. 1. 19-24.
48. Dąbrowski W. 2001. Czy grożą nam epidemie listeriozy? *Mikrobiol. Med.* 28. 10-14.
49. Dąbrowski W., Bogusławska-Wąs E., Daczkowska-Kozon E., Krasnosielska M., Różycka-Kasztelan K. 1999: Prevalence of *Listeria spp.* in meat and raw sausages. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 8/49. 2. 195-200.
50. Dąbrowski W., Daczkowska-Kozon E., Koronkiewicz A. 2001. Występowanie drobnoustrojów z rodzaju *Listeria* w wybranych surowcach, półproduktach i produktach rybnych. *Folia Univ. Agric. Stetin.* 1. 25-28.
51. Dąbrowski W., Iwański R., 2002. Publikacja z części badań w przygotowaniu do druku.
52. Dąbrowski W., Iwański R., Bednarska M., Mędrala D., 2001: The effect of culture conditions of hydrophobicity of strains of *Listeria monocytogenes* isolated from food. *EJPAU*. 5.1.
53. Dąbrowski W., Iwański R., Czeszejko K., 2001: Adhezyjność *Listeria SPP.* do struktur hydrofobowych. Opublikowano w materiałach zjazdowych XXXII Sesji Naukowej KTiChŻ PAN w Warszawie.
54. Dąbrowski W., Iwański R., Czeszejko K., Mędrala D., 2001: The influence of culture conditions on adhesion of *Listeria monocytogenes* to hexadecane. *EJPAU*.4.2.
55. Dąbrowski W., Różycka-Kasztelan K., Mędrala D., Skotarczak B. 2000. Occurrence of *Listeria spp.* in vacuum-packed smoked fish. *Folia Univ. Agric. Stetin.* 26. 23-28.
56. Daniels J.J., Autenrieth I.B, Goebel W., 2000: Interaction of *Listeria monocytogenes* with the intestinal epithelium. *FEMS Microbiol. Letters*. 190 (2). 323-328.
57. D'Aoust J.Y., 1994: Salmonella and international food trade. *Int. J. Food Microbiol.* 24. 11-31.
58. Delgado da Silva M.C., Destro M.T., Hofer E., Tibana A. 2001: Characterization and evaluation of some virulence markers of *Listeria monocytogenes* strains isolated from Brazilian cheeses using molecular, biochemical and serotyping techniques. *Int. J. Food Microbiol.* 63. 275-280.
59. Destro M.T. 2000. Incidence and significance of *Listeria* in fish and fish products from Latin America. *Int. J. Food Microbiol.* 62. 191-196.
60. Dickneite C., Böckmann R., Spory A., Goebel W., Sokolovic Z. 1998: Differential interaction of the transcription factor PrfA and the PrfA-activating factor(Paf) of *Listeria monocytogenes* with target sequences, *Mol. Microbiol.* 27. 915-928.
61. Dickson J.S., Siragusa G.R., 1994: Cell surface charge and initial attachment characteristics of rough strains of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*. 19 (4). 192-196.

62. Dicson J.S., Koohmaraie M., 1989: Cell surface charge characteristic and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. 55 (4). 832-836.
63. Dmitrieva N.F., Briko N.I., Vylegzhanina E.S., Kondrakova O.A., Eshchina A.S., Lisitsyna A.B., Beliakov V.D., 1996: The hydrophobicity of *Streptococcus pyogenes* as a possible marker of its virulence. *Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2. 21-24.
64. Doyle M. P., Beuchat L. R., Montville T. J. 1997: *Food microbiology, fundamentals and frontiers*, ASM Press, Washington D.C. 18. 337.
65. Doyle R.J., Rosenberg M., 1990: Microbial cell surface hydrophobicity. *American Society for Microbiology*, Washington D.C. 7. 158.
66. Eklund M.W., Poysky F.T., Paranjpye R.N., Lashbrook L.C., Peterson M.E., Pelroy G.A. 1995. Incidence and sources of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked fishery products and processing plants. *J. Food Prot.* 58. 502-508.
67. Erganis O., Kaya O., Corlu M., Istanbuluoglu E., 1989: Hemagglutination, hydrophobicity, enterotoxigenicity, and drug-resistance characteristic of avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* 33. 631-635.
68. Farber J.M. 1991. *Listeria monocytogenes* in fish products. *J. Food Prot.* 54. 922-924.
69. Farber J.M., Idziak E.S., 1984: Attachment of psychrotrophic meat spoilage bacteria to meat surface. *J. Food. Prod.* 47. 92-95.
70. Field L.H., Underwood J.L., Payne S.M., Berry L.J., 1993: Characteristic of an avirulent *Campylobacter jejuni* strain and its virulence-enhanced variants. *J. Med. Microbiol.* 38. 293-300.
71. Firstenberg-Eden R., 1981: Attachment of bacteria to meat surfaces: A review. *J. Food Prot.* 44. 602-607.
72. Flanary P.L., Allen R.D., Dons L., Kathariou S., 1999: Insertional inactivation of the *Listeria monocytogenes* cheYA operon abolishes response to oxygen gradients and reduces the number of flagella. *Can. J. Microbiol.* 45. 646-652.
73. Franco M.C, Quinto E.J., Fente C., Rodriguez-Otero J.L., Dominguez L., Cepeda A., 1995: Determination of the principal sources of *Listeria spp.* contamination in poultry meat and poultry processing plant. *Journal of Food Protection.* 58,12. 1320-1325.
74. Furowicz A.J. , Czernomysy-Furowicz D., 1992: Specyfika zakażeń *Listeria monocytogenes* i *Mycobacterium leprae* ze specjalnym uwzględnieniem zaburzeń układu nerwowego. *Medycyna Wet.* 48. 493-496.
75. Gahan C.G.M., O'Driscoll B., Hill C., 1996: Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods during milk fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (9). 3128-3132.
76. Genigeorgis C.A, Oanca D., Dutulescu D., 1990: Prevalence of *Listeria spp* in turkey meat at the supermarket and slaughterhouse level. *J. Food Prot.* 53. 282-288,
77. Giovannacci I., Ermel G., Salvat G., Vendevre J.L., Bellon-Fontaine M.N., 2000: Physicochemical surface properties of five *Listeria monocytogenes* strains from a pork-

- processing environment in relation to serotypes, genotypes and growth temperature. *Journal of Applied Microbiology*. 88. 992-1000.
78. Glee P.M., Cutler J.E., Benson E.E., Bargatzke R.F, Hazen K.C., 2001: Inhibition of hydrophobic protein-mediated *Candida albicans* attachment to endothelial cells during physiologic shear flow. *Infect. Immun.* 69. 2815-2820.
79. Gnanou Besse N., F. Dubois Brissonnet, V. Lafarge and V. Leclerc, 2000: Effect of various environmental parameters on the recovery of sublethally salt-damaged and acid-damaged *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* 89. 944-950.
80. Gospodarek E., 1994: Właściwości hydrofobowe *Acinetobacter calcoaceticus*. *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia*. 46. 13-18.
81. Handley P.S. 1990: Structure, composition and function of surface structures on oral bacteria. *Biofouling*. 2. 239-264.
82. Harvey J., Gilmour A. 2001. Characterization of recurrent and sporadic *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk and nondairy foods by pulsed-field gel electrophoresis, monocin typing, plasmid profiling, and cadmium and antibiotic resistance determination. *Appl. Environ. Microbiol.* 67. 840-84.
83. Hazen K.C., Brawner D.L., Riesselman M.H., Jutila M.A., Cutler J.E., 1991: Differential adherence of hydrophobic and hydrophilic *Candida albicans* yeast cells to mouse tissues. *Infect. Immun.* 59. 907-912.
84. Heinitz M.L., Johnson J.M. 1998. The incidence of *Listeria spp.*, *Salmonella spp.*, and *Clostridium botulinum* in smoked fish and Shellfish. *Journal of Food Protection*. 61. 318-323.
85. Herald P.A., Zottola E.A., 1988: Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *J. Food Sci.* 53. 1549-1562.
86. Herald P.A., Zottola E.A., 1988: Effect of various agents on the attachment of *Pseudomonas fragi* to stainless steel. *J. Food Sci.* 54. 461-464.
87. Hinton A. Jr., Ingram K.D., 2000: Use of oleic acid to reduce the population of the bacterial flora of poultry skin. *Journal of Food Protection*. 63(9). 1282-1286.
88. Hird D.W., Genigeorgias C. 1990: Listerios in food animals: clinical sings and lievstock as a potential source of direct (nonfood borne) infection for humans. *ELSAVIER*. 6. 31-39.
89. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. 1994: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* Ninth Edition. Williams & Wilkins. Baltimore. 19. 567.
90. Howard J.C., Heinemann C., Thatcher B.J., Martin B., Gan B.S., Reid G., 2000: Identification of collagen-binding proteins in *Lactobacillus spp.* with surface-enhanced laser desorption ionization-time of flight protein chip technology. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (10). 4396-4400.
91. Huillet E., Larpin S., Pardon P., Berche P., 1999: Identification of a new locus in *Listeria monocytogenes* involved in cellobiose-dependent repression of *hly* expression. *FEMS Microbiol. Letters*. 174 (2). 265-272.
92. Iturralde M., Aguilar B., Baselga R., Amorena B., 1993: Adherence of ruminant mastitis *Staphylococcus aureus* strains to epithelial cells from ovine mammary gland primary cultures and from a rat intestinal cell line. *Vet. Microbiol.* 38. 115-127.

93. Jacquet C., Gouin E., Jeannel D., Cossart P., Rocourt J., 2002: Expression of ActA, Ami, InlB, and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. Applied and Environmental Microbiology. 68 (2). 616-622.
94. Jana T.K., Srivastava A.K., Csery K., Arora D.K., 2000: Influence of growth and environmental conditions on cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas fluorescens* in nonspecific adhesion. Can. J. Microbiol. 46. 28-37.
95. Jankowski S., Sarowska J., Zarczyńska H., Cisowska A., 1997: Hydrophobic properties of *Pseudomonas aeruginosa* strains. Med. Dośw. Mikrobiol. 49. 187-190.
96. Johansson T., Rantala L., Palmu L., Honkanen-Buzalski T. 1999: Occurrence and typing of *Listeria monocytogenes* strains in retail vacuum-packed fish products and in a production plant. Int. J. Food Microbiol. 47. 111-119.
97. Juneja V.K., Foglia T.A., Marmer B.S., 1998: Heat resistance and fatty acid composition of *Listeria monocytogenes*: effect of pH, acidulant and growth temperature. Journal of Food Protection. 61 (6). 683-687.
98. Kampelmacher E.H., Van Noorle Jansen L.M., 1980: Listeriosis in humans and animals in the Netherlands (1958-1977). Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. 246. 211-227.
99. Kanclerska J., Kanclerski K., Hryniewicz W., 1990: Rola powierzchniowych struktur *Streptococcus agalactiae* w przyleganiu tych drobnoustrojów do nabłonków. Med. Dośw. Mikrobiol. 42. 101-107.
100. Karunasagar I., Karunasagar I. 2000. *Listeria* in tropical fish and fishery products. Int. J. Food Microbiol. 62. 177-181.
101. Kaya M., Gokalp H.Y., 1997: Incidence of *Listeria spp* in Turkish style dry sausage. Fleischwirtschaft. 77. 275-276.
102. Kędzia W., Koniar H. 1974: Diagnostyka mikrobiologiczna. 12. 146.
103. Kim J., Doores S., 1993: Attachment of *Salmonella typhimurium* to skins of turkey that had been defeathered through three different systems: Scanning electron microscopic examination. J. Food Prot., 59: 395-400.
104. Knight M.T., J.F. Black and D.W. Wood, 1988: Industry perspectives on *Listeria monocytogenes*. J.Assoc. Anal. Chem. 71. 682-683.
105. Koljalg S., Vuopio-Varkila J., Lyytikäinen O., Mikelsaar M., Wadstorm T., 1996: Cell surface properties of *Acinetobacter baumannii*. APMIS. 104. 659-665.
106. Kooksey D.K., Klein B.P., McKeith F.K., Blaschek H.P., 1993: Reduction of *Listeria monocytogenes* in precooked vacuum-packed beef using postpackaging pasteurization. Journal of Food Protection. 56 (12). 1034-1038.
107. Kreft J., Vazquez-Boland J.A., 2001: Regulation of virulence in *listeria*. Int. J. Med. Microbiol. 291 (2). 145-157.
108. Kwiatek K. 1993. Występowanie *Listeria monocytogenes* w mięsie oraz produktach mięsnych. Życie Wet. 68. 304-306.
109. Kwiatek K. 2002: Występowanie *Listeria monocytogenes* w wybranych środkach spożywczych. XXXIII Sesja Naukowa Komitetu Technologii i Chemii Żywności PAN: 'Nauka o żywności – osiągnięcia i perspektywy'. 10-11.IX.2002, Lublin.

110. Kwiatek K., Rola J., Różańska H., 1989: *Listeria monocytogenes* – znaczenie epidemiologiczne i epizootologiczne. *Medycyna Wet.* 45. 200-204.
111. Kwiatek K., Wojtyń B., 1993: *Listeria monocytogenes* przyczyną zakażeń pokarmowych u ludzi. *Gosp. Mięsna.* 45. 32-34.
112. Kwiatek K. 1993: Występowanie *L. monocytogenes* w mięsie oraz produktach mięsnych. *Życie weterynaryjne.* 12. 304-306.
113. Leon O., Panos C., 1990: *Streptococcus pyogenes* clinical isolates and lipoteichoic acid. *Infect. Immun.* 58. 3779-3787.
114. Leriche V., Carpentier B., 2000: Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *Journal of Applied Microbiology.* 88. 594-605.
115. Lers N., Stojiljkovic I., Trgovcevic Z., Kalenic S., Salaj-Smic E., 1990: Determination of plasmid-associated hydrophobicity of *Yersinia enterocolitica* by the salting-out test. *Zentralbl. Bacteriol.* 273. 313-318.
116. Levine P., Rose B., Green S., Ransom G., Hill W., 2001: Pathogen testing of ready-to-eat meat and poultry products collected at Federally Inspected Establishments in the United States, 1990 to 1999. *Journal of Food Protection.* 64(8). 1188-1193.
117. Li J., McLandsborough L.A., 1999: The effects of surface charge and hydrophobicity of *Escherichia coli* on its adhesion to beef muscle. *International Journal of Food Microbiology.* 53 (2/3). 185-193.
118. Lichtenberg D., Rosenberg M., Scharfman N., Ofek I., 1985: A kinetic approach to bacterial adherence to hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Lett.* 4. 141-146.
119. Linton C.J., Sherriff A., Millar M.R., 1999: Use of a modified robbins device to directly compare the adhesion of *Staphylococcus epidermidis* RP62A to surfaces. *Journal of Applied Microbiology.* 86. 194-202.
120. Ljung A., Hjerten S., Wadström T., 1985, *Infect. Immun.* 47. 552.
121. Llanos J., Garcia-Tello P., 2000: Role and behaviour of the hydrophobic conditions in bacterial adhesion to incurrent siphon in *bivalve molluse*. *Acta Microbiol. Pol.* 49. 75-82 - abstrakt, baza MEDLINE.
122. Lobashevskii A.L., 1992: The hydrophobicity of gram-negative bacteria isolated from patients with inflammatory and suppurative-destructive lung diseases. *Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol.* 9-10. 24-26.
123. Loo C.Y., Willcox M.D., Knox K.W., 1994: Surface-associated properties of *Actinomyces* strains and their potential relation to pathogenesis. *Oral Microbiol. Immunol.* 9. 12-18.
124. Mafu A.A., Roy D., Goulet J., Megny P., 1990: Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times. *J. Food Prot.* 53. 742-746.
125. Mafu A.A., Roy D., Goulet J., Savoie L., 1991: Characterization of physicochemical forces involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to surfaces. *Applied and Environmental Microbiology.* 57 (7). 1969-1973.

126. Maisnier-Patin S., Richard J., 1996: Cell wall changes in nisin-resistant variants of *Listeria innocua* grown in the presence of high nisin concentrations, FEMS Microbiology Letters. 140(1). 29-35.
127. Mallory I., Austin M.B., Colwell R.R., 1977: Numerical taxonomy and ecology of oligotrophic bacteria isolated from the estuarine environment" can. J. Microbiol. 23. 733-750.
128. Manzano M., Cocolin L., Cantoni C., Comi G. 1997b. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* from milk and cheese by a single-step PCR. Mol. Biotechnol. 7. 85-88.
129. Marco A.J., Altimira J., Prats N., Lopez S., Dominguez L., Domingo M., Briones V., 1997: Penetration of *Listeria monocytogenes* in mice infected by the oral route. Microbial Pathogenesis. 32(5). 255-263.
130. Margolles A., Mayo B., de los Reyes-Gavilán C.G. 1998: Polymorphism of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains isolated from short-ripened cheeses. J. Appl. Microbiol. 84. 255-262.
131. Margolles A., Mayo B., de los Reyes-Gavilán C.G. 2000: Phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains isolated from short-ripened cheeses. Food Microbiol. 17. 461-467.
132. Markiewicz Z., 1993: Struktura i funkcje osłon bakteryjnych. PWN Warszawa.
133. Martin M.L., Benito Y., Pin C., Fernandez M.F., Garcia M.L., Selgas M.D., Casas C., 1997: Lactic acid bacteria: hydrophobicity and strength of attachment to meat surfaces. Letters in Applied Microbiology. 24 (1). 14-18.
134. McCarthy S.A., 1990: Listeria in environment. W "Foodborne listeriosis" A.L. Miller i wsp. ELSAVIER. 5. 25-29.
135. McKellar R.C., Paquet A., Ma C.Y., 1992: Antibacterial activity of fatty N-acylamino acids against gram positive foodborne pathogens. Food Microbiol. 9.67-76.
136. Meadows P.S., 1971: The attachment of bacteria to solid surfaces. Arch. Microbiol. 75. 374-381.
137. Medrzycka K.B., 1991: The effect of particle concentration in extremely dilute solutions. Colloid Polym. Sci. 269. 85-90.
138. Meylheuc T., Giovannacci I., Briandet R., Bellon-Fontaine M.-N., 2002: Comparison of the cell surface properties and growth characteristics of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. Journal of Food Protection. 65 (5). 786-793.
139. Michel E., Cossart P., 1992: Physical map of the *Listeria monocytogenes* chromosome, J. Bacteriol. 174. 7098-7103.
140. Mokracka J., Koczura R., Kaznowski A., 2002: Wyspy patogenności. Postępy Mikrobiologii. 41 (1). 51-69.
141. Molnar C., Hevessy Z., Rozgonyi F., Gemmmell C.G., 1994: Pathogenicity and virulence of coagulase negative staphylococci in relation to adherence, hydrophobicity, and toxin production in vitro. J. Clin. Pathol. 47. 743-748.
142. MSU internet page, 2002: Listeria. <http://www.msu.edu/course/fsc/840/lect-11.pdf>.

143. Mukherjee R.M., Bhol K.C., Mehra S., Maitra T.K., Jalan K.N., 1992: High cell surface hydrophobicity of virulent *Entamoeba histolytica* isolates. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86. 396-398.
144. Myers E.R., Martin S.E., 1994: Virulence of *Listeria monocytogenes* propagated in NaCl containing media at 4, 25 and 37°C. *Journal of Food Protection.* 57(6). 475-478.
145. Nagao P.E., Benchetrit L.C., 1999: Virulent and avirulent strains of group B streptococci from Rio de Janeiro, Brazil. Relationship between differences in surface hydrophobicity, sialic acid content and macrophage interaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 94. 497-498.
146. Naito Y., Tohda H., Okuda K., Takazoe I., 1993: Adherence and hydrophobicity of invasive and noninvasive strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol. Immunol.* 8. 195-202.
147. Nørrung B., Andersen J.K., 2000: Variations in virulence between different Electrophoretic types of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology.* 30. 228-232.
148. Norton D.M., Scarlett J.M., Horton K., Sue D., Thimothe J., Boor K.J., Wiedmann M., 2001: Characterization and pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* isolates from the smoked fish industry. *Applied and Environmental Microbiology.* 67(2). 646-653.
149. Norwood D.E., Gilmour A., 1999: Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. *Journal of Applied Microbiology.* 86. 576-582.
150. Notermans S., Kampelmacher E.H., 1974: Attachment of some bacterial strains to the skin of broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 15. 573-585.
151. O'Discoll B., Gahan C.G.M., Hill C., 1996: Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Applied and Environmental Microbiology.* 62: 1693-1698.
152. Ojeniyi B., Christensen J., Bisgaard M., 2000: Comparative investigations of *Listeria monocytogenes* isolated from a turkey processing plant, turkey products, and from human cases of listeriosis in Denmark. *Epidemiol Infection.* 125 (2). 303-308.
153. Ouattara B., Simard R.B., Holley R.A. Piette G.J.P., Begin A., 1997: Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Int. J. Food Microbiol.* 37.155-162.
154. Paerregaard A., Espersen F., Jensen O.M., Skurnik M., 1991: Interactions between *Yersinia enterocolitica* and rabbit ileal mucus: growth, adhesion, penetration, and subsequent changes in surface hydrophobicity and ability to adhere to ileal brush border membrane vesicles. *Infect. Immun.* 59. 253-260.
155. Parker M.L., Brocklehurst T.F., Gunning P.A., Coleman H.P., Robins M.M., 1995: Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: I—methods for investigating the form of growth. *J. Appl. Bacteriol.* 78(6). 601-608.
156. Portnoy D.A., Jacks P.S., Hinrichs D.J., 1988: Role of hemolysin for the intercellular growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Experimental Medicine.* 167. 1459-1471.
157. Pron B., Boumaila C., Jaubert F., Sarnecki S., Monnet J-P., Berche P., Gaillard J-L., 1998: Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system. *Infection and Immunity.* 66 (2). 747-755.

158. Randhawa J.S., Chambers P., Pringle C.R., Easton A.J., 1995: Nucleotide sequences of the genes encoding the putative attachment glycoprotein (G) of mouse and tissue culture-passaged strains of *pneumonia* virus of mice. *Virology*. 207. 240-245.
159. Roche S.M., Velge P., Bottreau E., Durier C., Marquet van der Mee N., Pardon P., 2001: Assessment of the virulence of *Listeria monocytogenes*: agreement between a plaque-forming assay with HT-29 cells and infection of immunocompetent mice. *International Journal of Food Microbiology*. 68. 33-44.
160. Rocourt J., Cossart P. *Listeria monocytogenes* w: *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. ASM. Washington. 18. 337-351.
161. Rodrigou-Szulc U.N., Ventoura G., Mackey B.M., Payne M.J., 1996: Rapid physicochemical detachment of bacteria from beef surfaces *J. Appl. Bacteriol.* 80. 673-681.
162. Rosenberg M., 1984. *FEMS Microbiol. Lett.* 22. 298.
163. Rudolf M., Scherer S., 2001: High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 22 (1-2). 91-98.
164. Saa E., Kruze J., 1995: Virulence factors of coagulase-negative *Staphylococcus* of human and bovine origin. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 37. 201-208.
165. Saide-Alboprnoz J.J., Knipe C.L., Murano E.A., Beran G.W., 1995: Contamination of pork carcasses during slaughter fabrication and chilled storage. *J. Food Prot.* 58. 993-997.
166. Saklani-Jusforgues H., Fontan E., Goossens P.L., 2000: Effect of acid-adaptation on *Listeria monocytogenes* survival and translocation in a murine intragastric infection model. *FEMS Microbiology Letters*. 193. 155-159.
167. Salamina G., Donne E.D., Niccolini A., Poda G., Cesaroni D., Bucci M., Fini R., Maldini M., Schuchat A., Swaminathan B., Bibb W., Rocourt J.R., Binkin N., Salmso S., 1996: A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. *Epidemiology and Infection*. 117(3). 429-436.
168. Santiago N.I., Zipf A., Bhunia A.K., 1999: Influence of temperature and growth phase on expression of a 104-kilodalton *Listeria* adhesion protein in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (6). 2765-2769.
169. Schlegel H.G., 2000: *Mikrobiologia ogólna*. PWN. 17. 655.
170. Sheikh-Zeinoddin M., Pehinec T.M., Hill S.E., Rees C.E.D., 2000: Maillard reaction causes suppression of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 61. 41-49.
171. Sikorski Z.E. 1996: *Listeria monocytogenes* w wędzonych rybach. *Medycyna wet.* 52. 295-297.
172. Smith L. T. 1996.: Role of osmolytes in adaptation of osmotically stressed and chill-stressed *Listeria monocytogenes* grown in liquid media and on processed meat surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. 62. 3088-3093.
173. Smoot L.M., 1997: Effect of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* Scott A to attach to food contact surfaces. *Hygiene and Toxicology*. 57 (11). 6682.

174. Smoot L.M., Pierson M.D., 1998: Influence of environmental stress on kinetics and strenght of attachment of *Listeria monocytogenes* Scoot A to buna-n rubber. Journal of Food Protection. 61. 1286-1292.
175. Sprong R.C., Hulstein M.F., Van der Meer R., 1999: High intake of milk fat inhibits intestinal colonization of *Listeria* but not of salmonella in rats. Journal of Nutrition. 129(7). 1382-1389.
176. Stryer L., 1997: Biochemia. PWN, Warszawa.
177. Talbot N.J., Kershaw M.J., Wakley G.E., De Vries O., Wessels J., Hammer J.E., 1996: MPG1 encodes a fungal hydrophobin involved in surface interactions during infection-related development of *Magnaporthe grisea*. Plant. Cell. 8. 985-999.
178. Taylor C.M., Beresford M., Epton H.A.S., Sigee D.C., Shama G., Andrew P.W., Roberts I.S., 2002: *Listeria monocytogenes relA* and *hpt* mutants are impaired in surface-attached growth and virulence. Journal of Bacteriology. 184 (3). 621-628.
179. Teti G., Tomasello F., Chiofalo M.S., Orefici G., Mastreoeni P., 1987. Infect. Immun. 55. 3057.
180. Uberos J., Molina A., Liebana J., Augustin M.C., Munoz A., 2000: The influence of different concentrations of melatonin on the cell surface hydrophobic characteristic of *Neisseria meningitides*. Lett. Appl. Microbiol. 31. 294-298.
181. Van der Mei H.C., De Vries J., Busscher H.J., 1993, Hydrophobic and Electrostatic Cell Surface Properties of Thermophilic Dairy *Streptococci*, Applied and Environmental Microbiology. 59 (12). 4305-4312.
182. Van Langendonck N., Bottreau E., Bailly S., Tabouret M., Marly P., Pardon P., Velge P., 1998: Tissue culture assays using Caco-2 cell line differentiate virulent from non-virulent *Listeria monocytogenes* strains. Journal of Applied Microbiology. 85(2). 337-346.
183. Van Loosdrecht M.C.M., Lyklema J., Norde W., Schraa G., Zehnder A.J.B., 1987: Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. Applied and Environmental Microbiology. 53. 1898-1901.
184. Vatanyoopaisarn S., Nazli A., Dodd C.E.R., Rees C.E.D., Waites W.M., 2000: Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. Applied and Environmental Microbiology. 66 (2). 860-863.
185. Vatsos I.N., Thompson K.D., Adams A., 2001: Adhesion of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* to unfertilized eggs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and n-hexadecane. Lett. Appl. Microbiol. 33. 178-182.
186. Vázquez-Boland J.A., Domínguez-Bernal G., González-Zorn B., Kreft J., Goebel W., 2001: Pathogenity islands and virulence evolution in *Listeria*. Microbes and Infection. ELSAVIER. 3. 571-584.
187. Velge P., Bottreau E., Van-Zangendonch N., Kaeffer B., 1997: Cell proliferation enhances entry of *Listeria monocytogenes* into intestinal epithelial cells by two proliferation-dependent entry pathways. J. Med. Microbiol. 46. 681-692.
188. Walls I., Cooke P.H., Benedict R.C., Buchanan R.L., 1993: Sausage casings as a model for attachment of *Salmonella* to Meat. J. Food Prot. 56 (3). 390-394

189. Wang C., Muriana P., 1994: Incidence of *Listeria monocytogenes* in packages of retail franks. *J. Food Prot.* 57. 382-396.
190. Wang L.L., Johnson E.A., 1992: Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Applied and Environmental Microbiology.* 58 (2). 624-629.
191. Wariiner K., Eveleigh K., Goodman J., Betts G., Gonzales M., Waites W.M. 2001: Attachment of bacteria from steam-pasteurized carcasses. *J. Food Prot.* 64(4). 493-497.
192. Wemekamp-Kamphuis H.H., Karatzas A.K., Wouters J.A., Abee T., 2002: Enhanced levels of cold shock proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon exposure to low temperature and high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology.* 68. 456-463.
193. Wibawan I.W., Lammler C., 1993: Relation between serotype of streptococci of serological group B and growth rate at early logarithmic phase. *Zentralbl. Veterinarmed [B].* 40. 430-436.
194. Williams R.C., Golden D.A., 2001: Influence of modified atmospheric storage, lactic acid, and NaCl on survival of sublethally heat-injured *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology.* 64(3). 379-386.
195. Zaręba M. L., Borowski J. 1997: *Mikrobiologia lekarska.* PZWL. Warszawa. 3. 314.

Tab. 5. Zróżnicowane hydrofilnośći szczytów L. muscivorum w zależności od warunków wzrostu.

	Temp. wzrostu 30°C	Temp. wzrostu 20°C	Temp. wzrostu 40-45°C	Temp. wzrostu 20-25°C	Temp. wzrostu 15-20°C	Temp. wzrostu 20-25°C	Temp. wzrostu 25-30°C	Temp. wzrostu 20-25°C	Temp. wzrostu 20-25°C	Temp. wzrostu 20-25°C	Temp. wzrostu 20-25°C	Temp. wzrostu 20-25°C
I-VI
III-VII
I-III
I-V
II-VI
II-VI
II-VI
II-VI
II-VI
II-VI

8. TABELLE

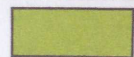
szczyt hydrofilowy (1)

szczyt przyrostowy (2)

szczyt hydrofilowy (1)

Tab.5. Zróżnicowanie hydrofobowości szczepów *L. monocytogenes* w zależności od warunków wzrostu.

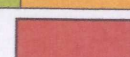
	agar zwykły 30°C	bulion odżywczy 30°C	agar cukrowy 30°C	BHI 24h 30°C	BHI 45 dni 4°C	BHI 24h 30°C olive oil	BHI 24h 30°C próżnia	BHI 45 dni 4°C próżnia	BHI 45 dni 4°C olive oil	BHI 24h 30°C HCl	BHI 24h 30°C kwas mlekowy	BHI 24h 30°C kwas octowy	BHI 24h 30°C NaCl	SUMA
4 - XI	2		1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	15
4 - IX	1		1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	16
34 - X	2		2	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	16
61	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	2	1	1	16
15	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	17
19	1	3	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	17
3 - VII	1	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1	17
2 - XVI	1	2	1	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2	18
1 - IV	1	1	1	2	2	1	1	1	1	2	1	2	3	19
3 - V	2	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2	1	3	20
LM - 1577	3	2	2	3	3	1	1	1	1	2	2	1	2	24



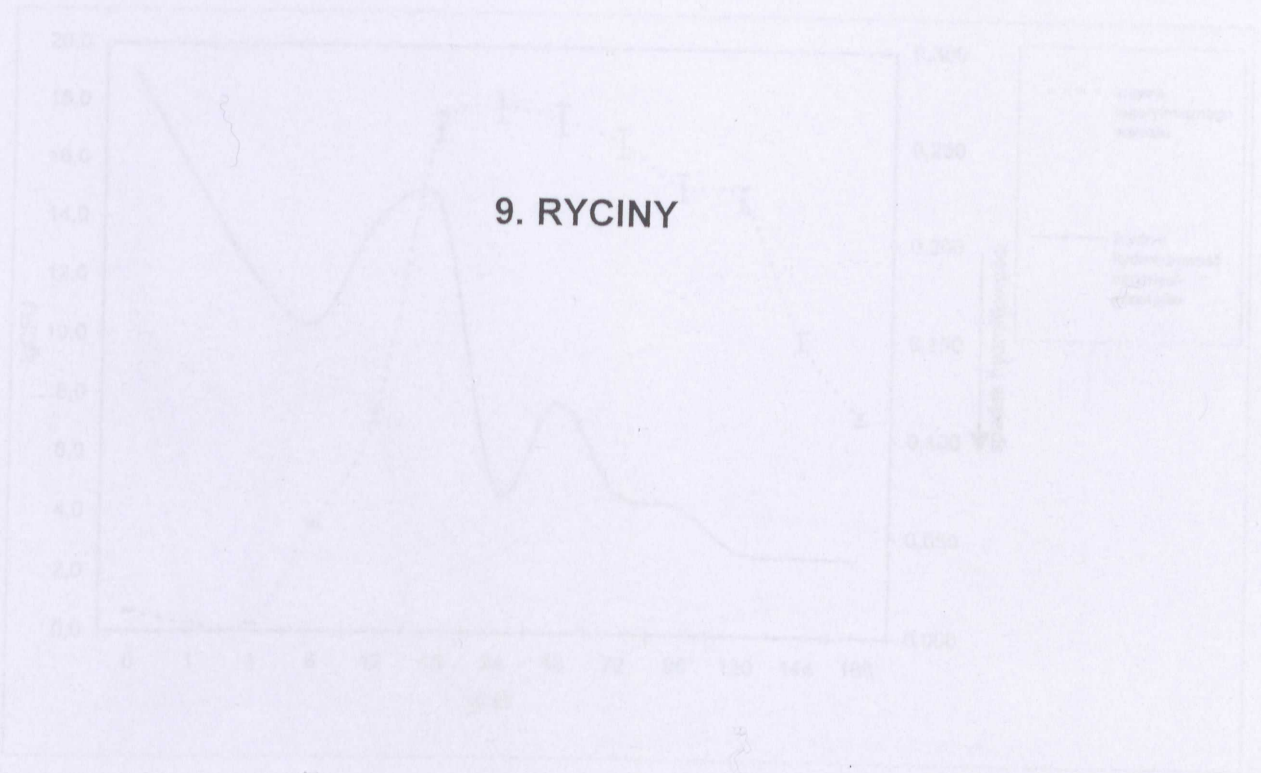
szczep hydrofilowy (1)



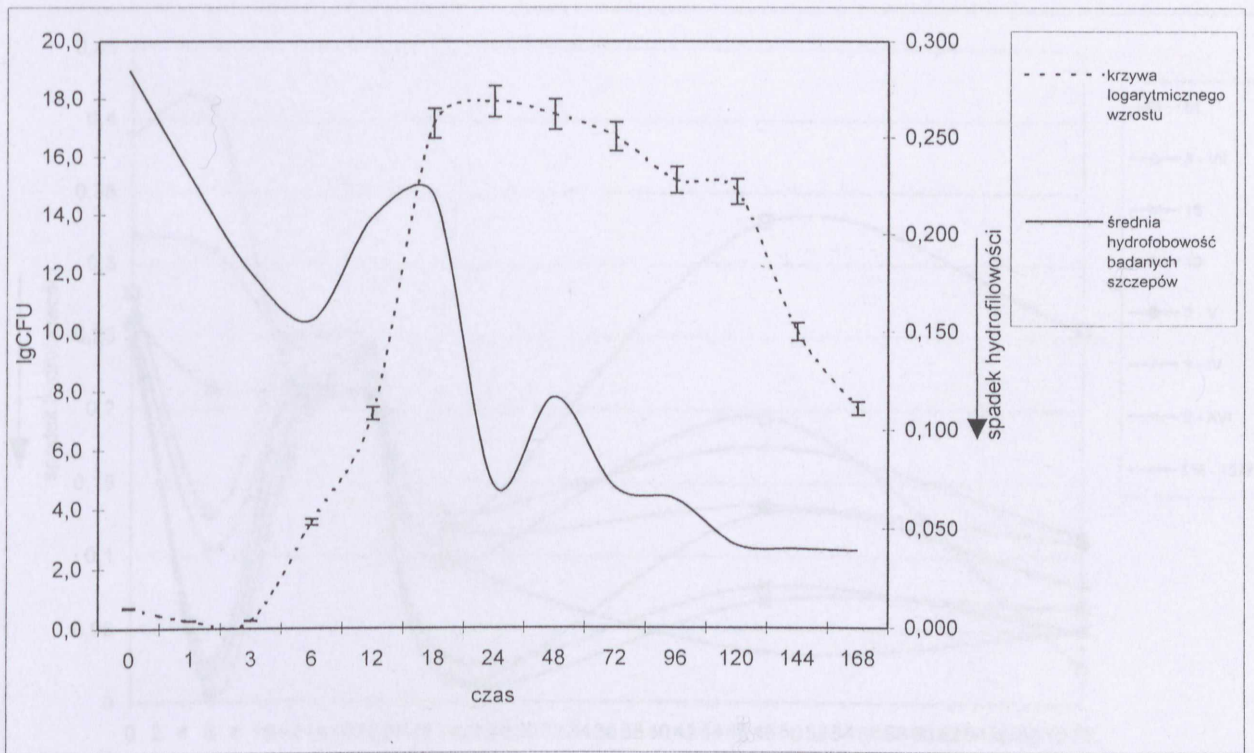
szczep przejściowy (2)



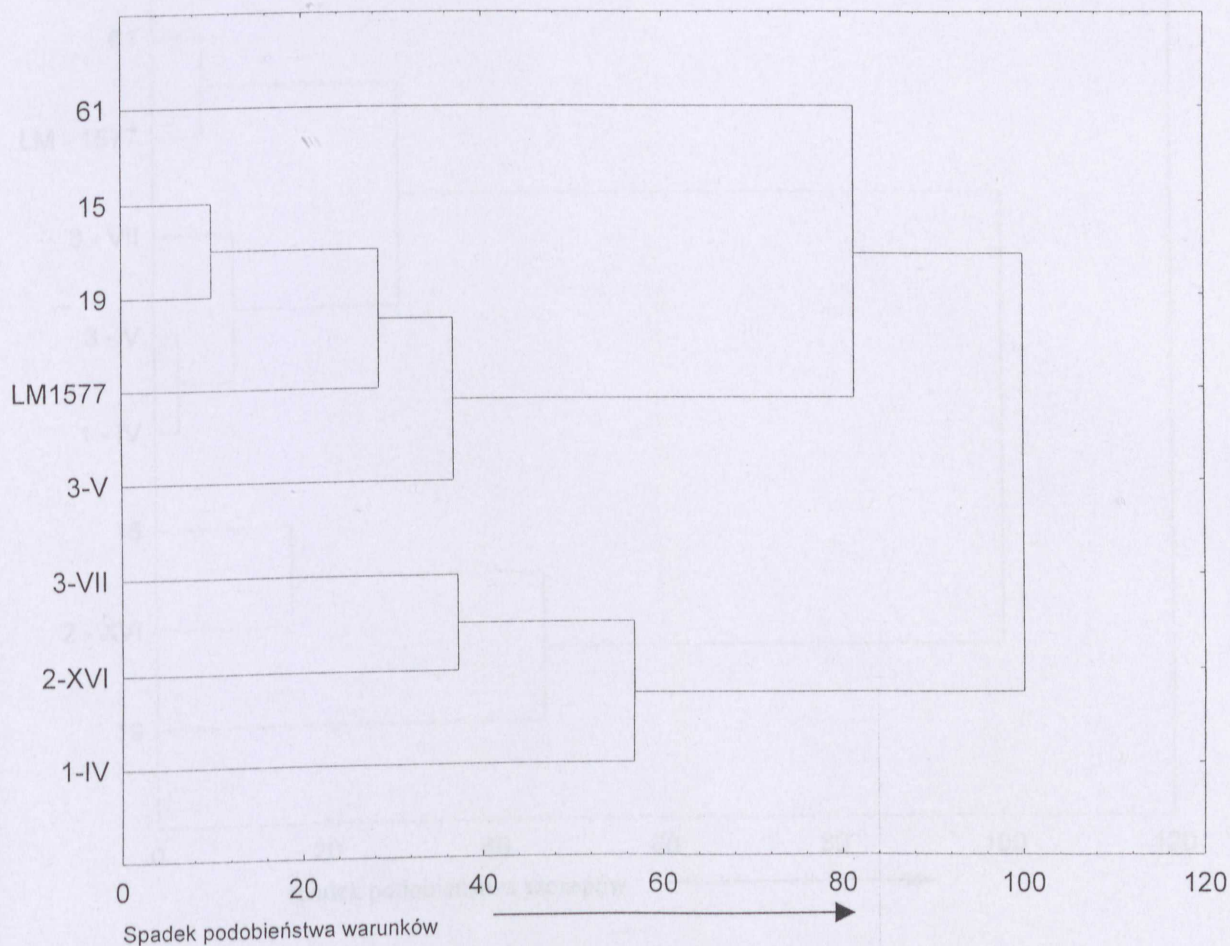
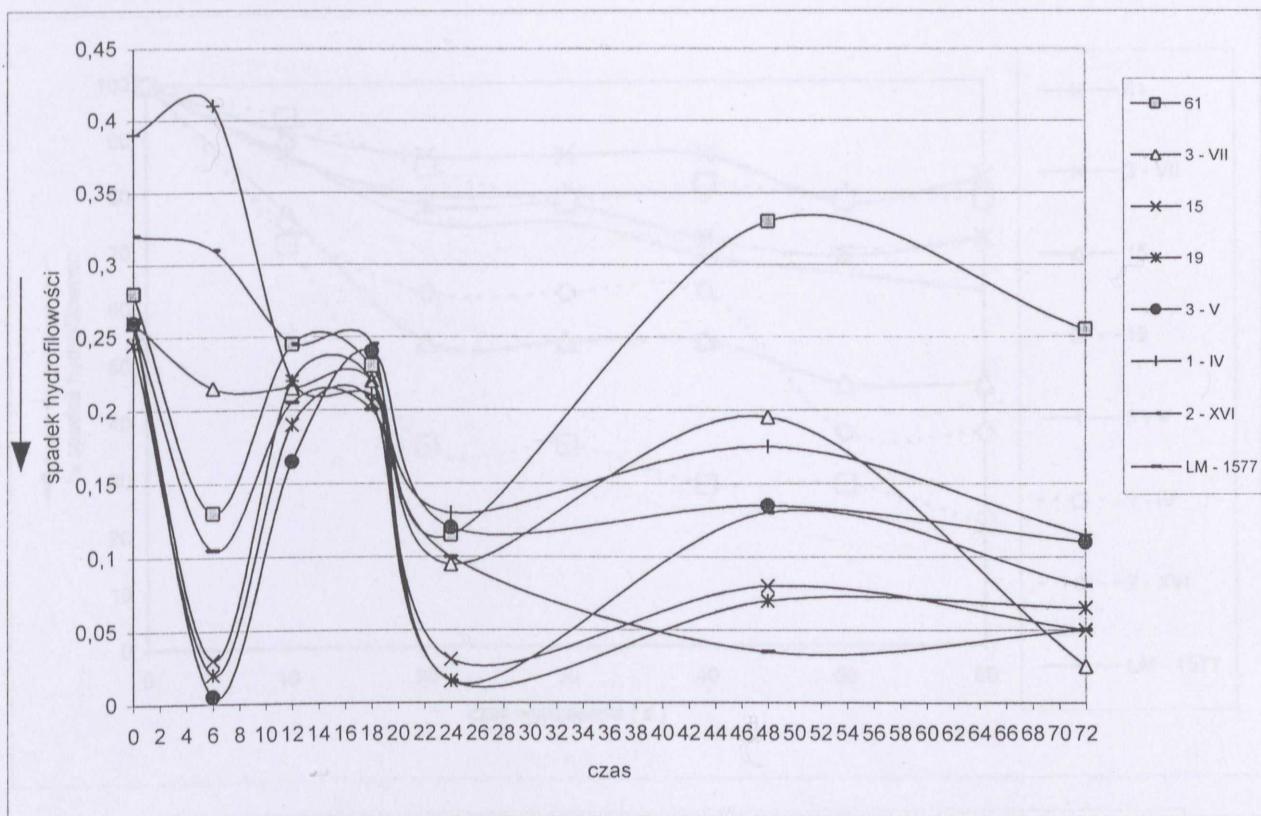
szczep hydrofobowy (3)

Ryc. 4. Krzywe logarytmicznego wzrostu szczepu 1 M-1577 *Listeria monocytogenes*.

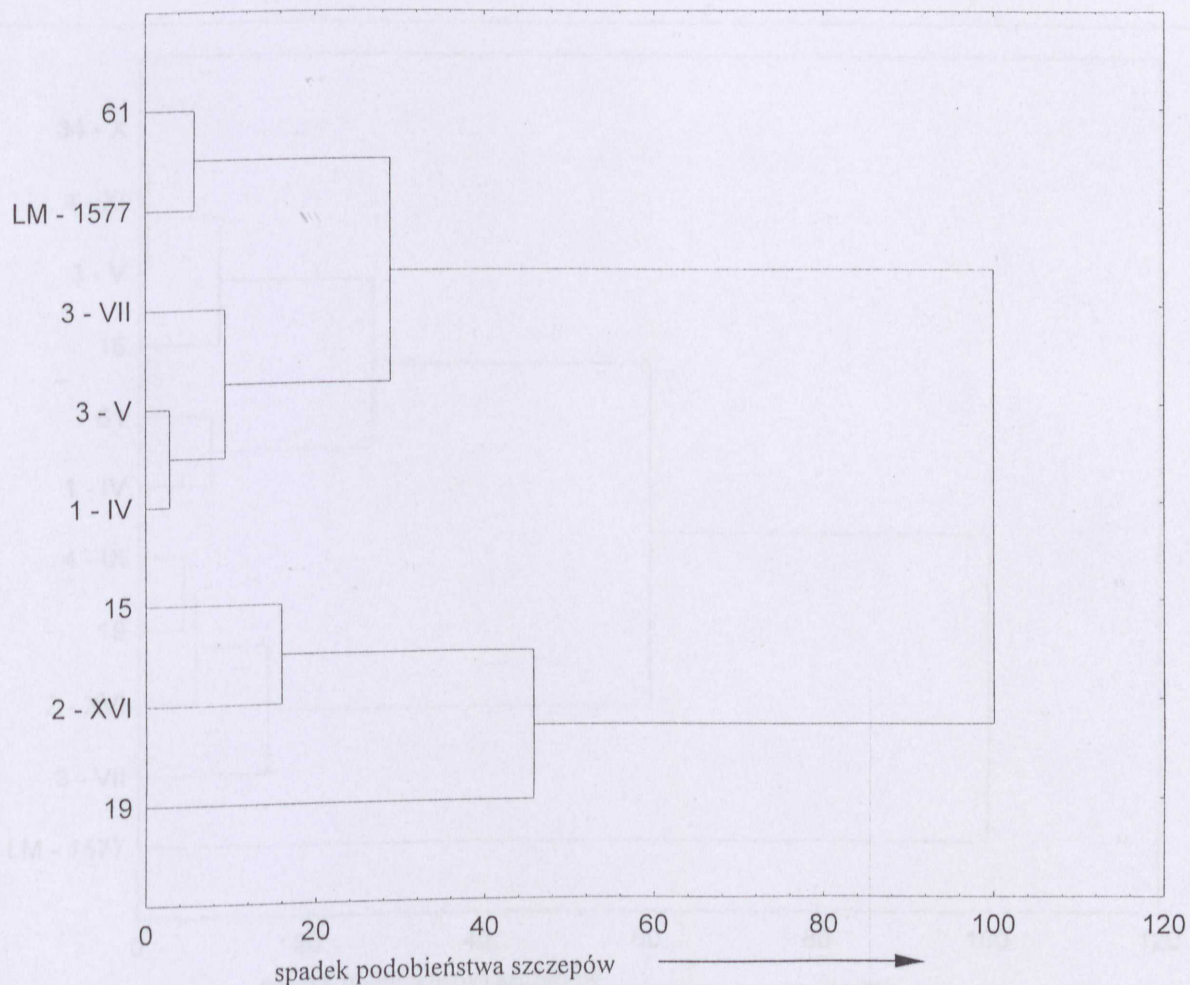
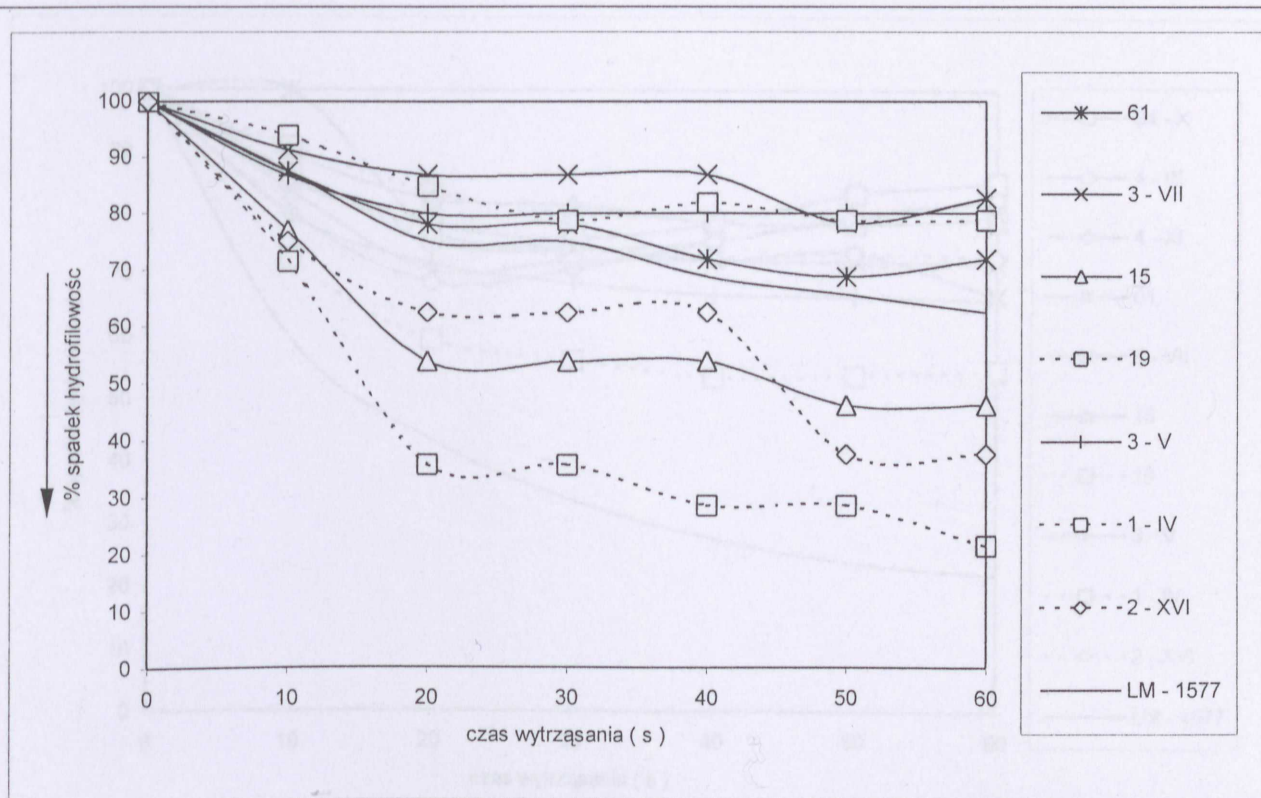
Ryc.4. Krzywa logarytmicznego wzrostu szczepu LM-1577 *Listeria monocytogenes*.



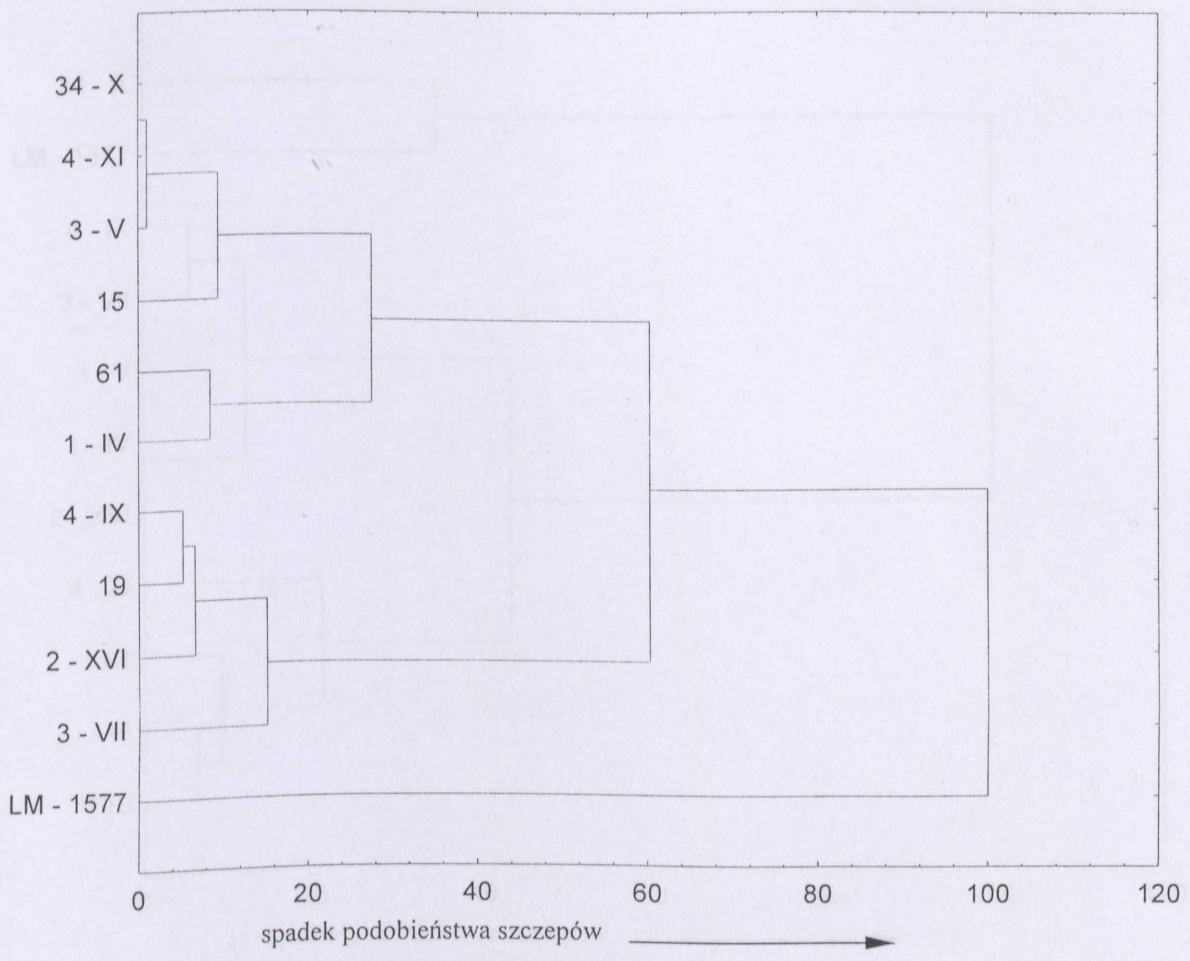
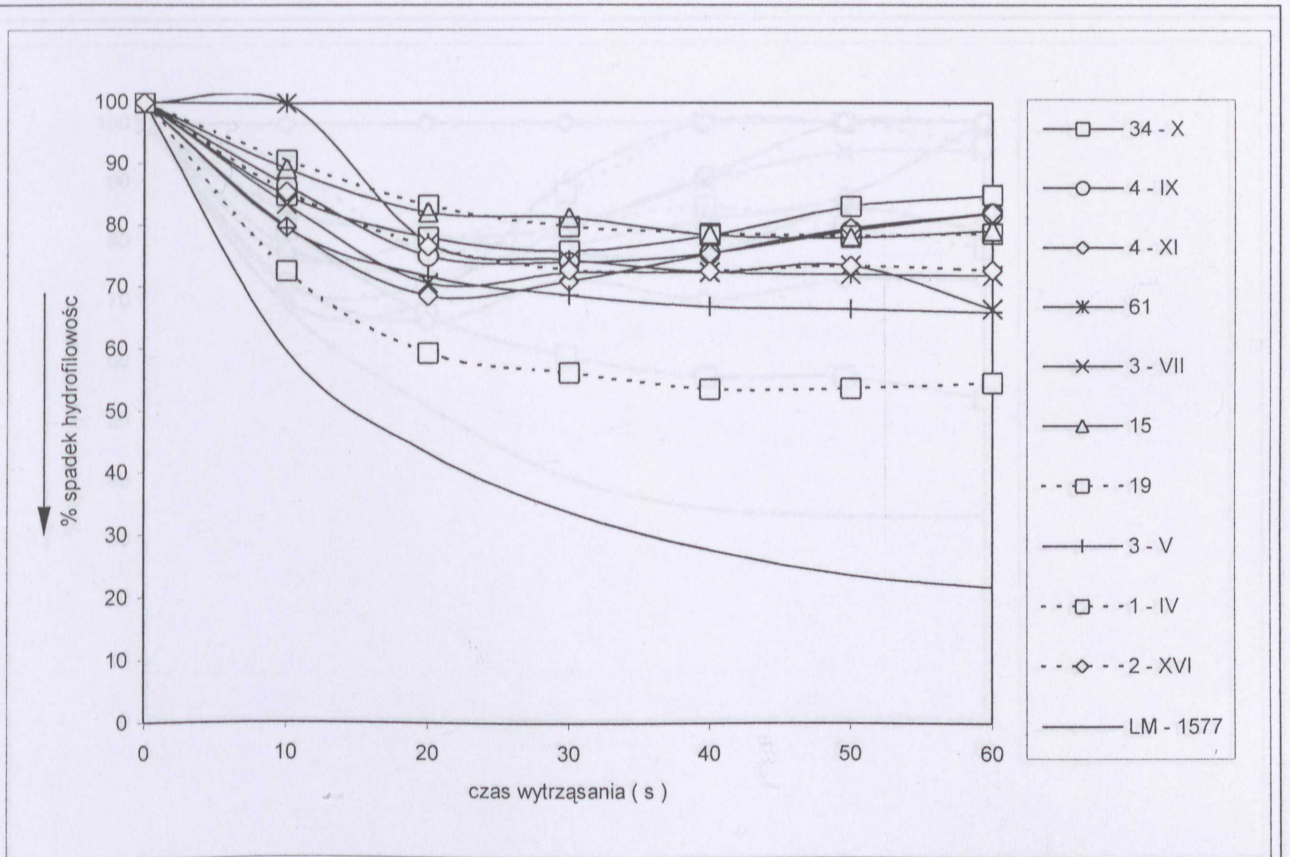
Ryc.5. Hydrofobowość i dendrogram podobieństwa szczepów *Listeria monocytogenes* hodowanych na podłożu BHI płynnym Czas inkubacji 0-72h, temperatura inkubacji 30°C.



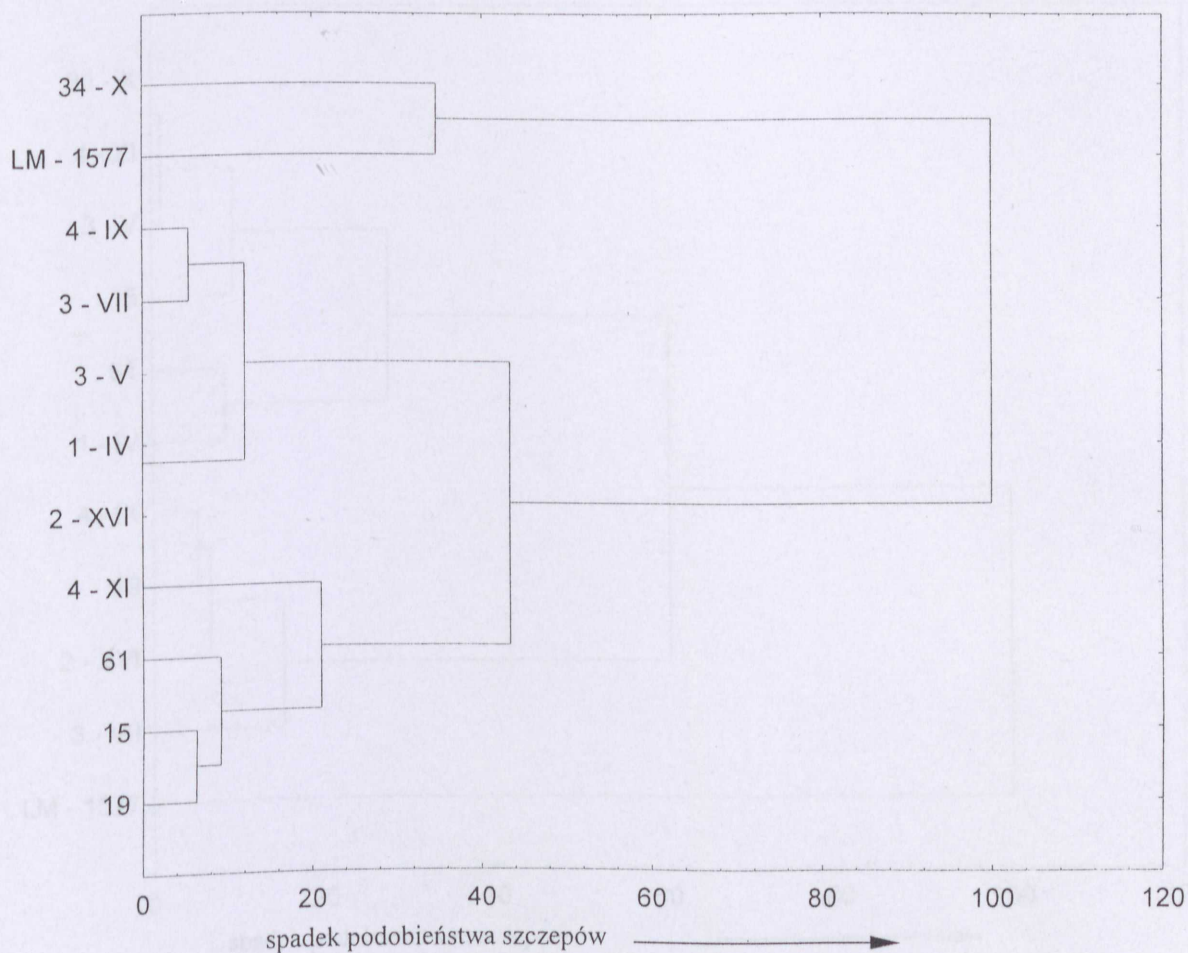
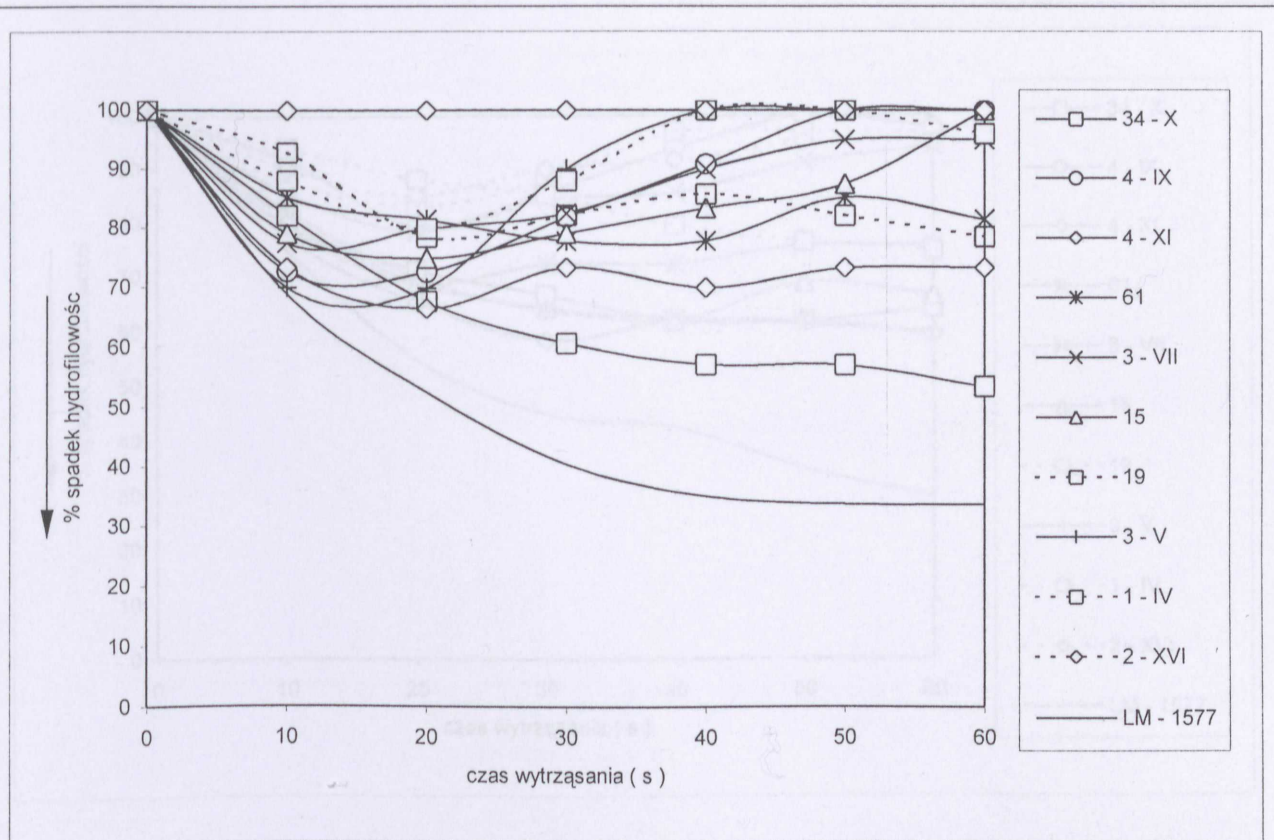
Ryc. 6. Hydrofobowość i dendrogram podobieństwa szczepów *L. monocytogenes* hodowanych na BHI płynnym. Czas inkubacji 24h, temperatura inkubacji 30⁰C.



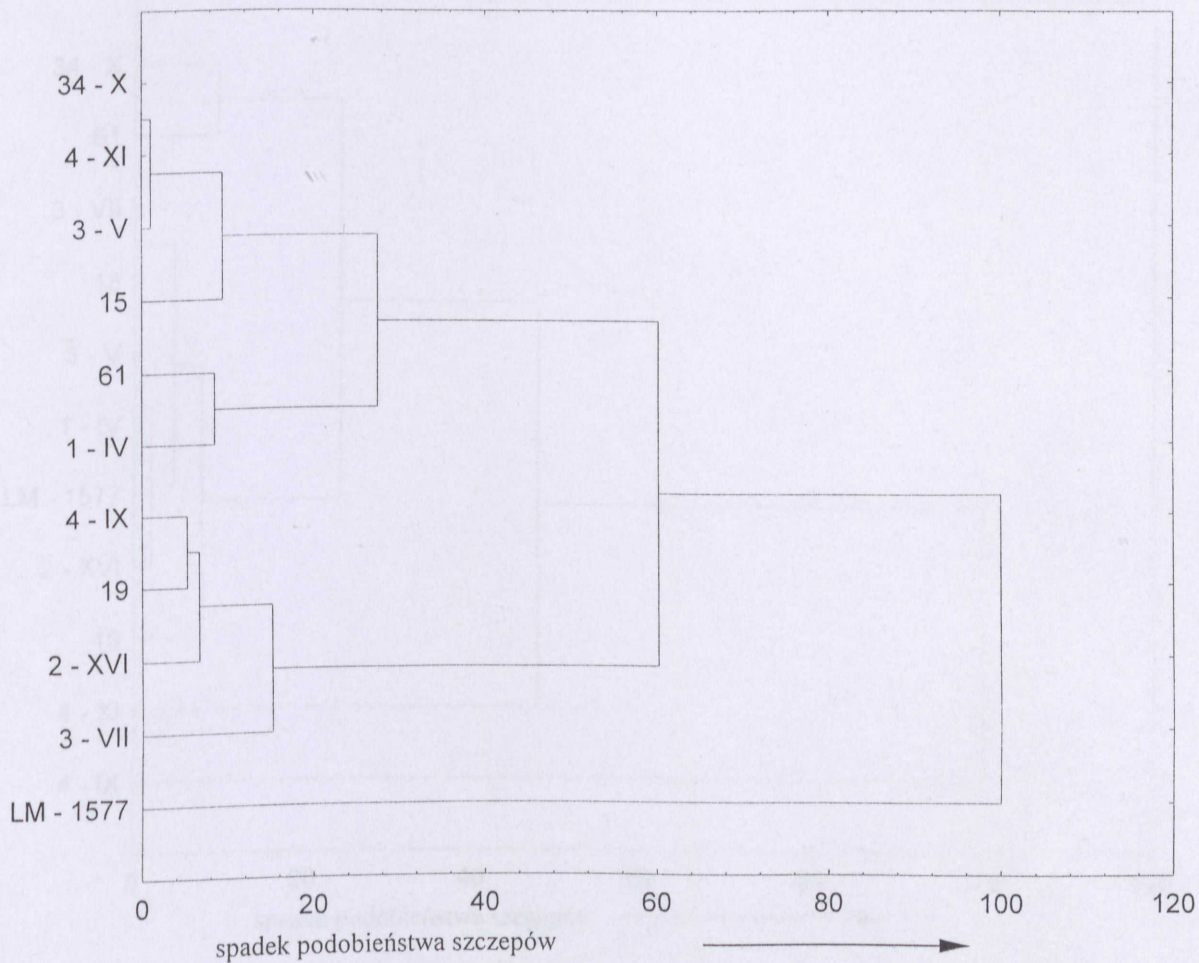
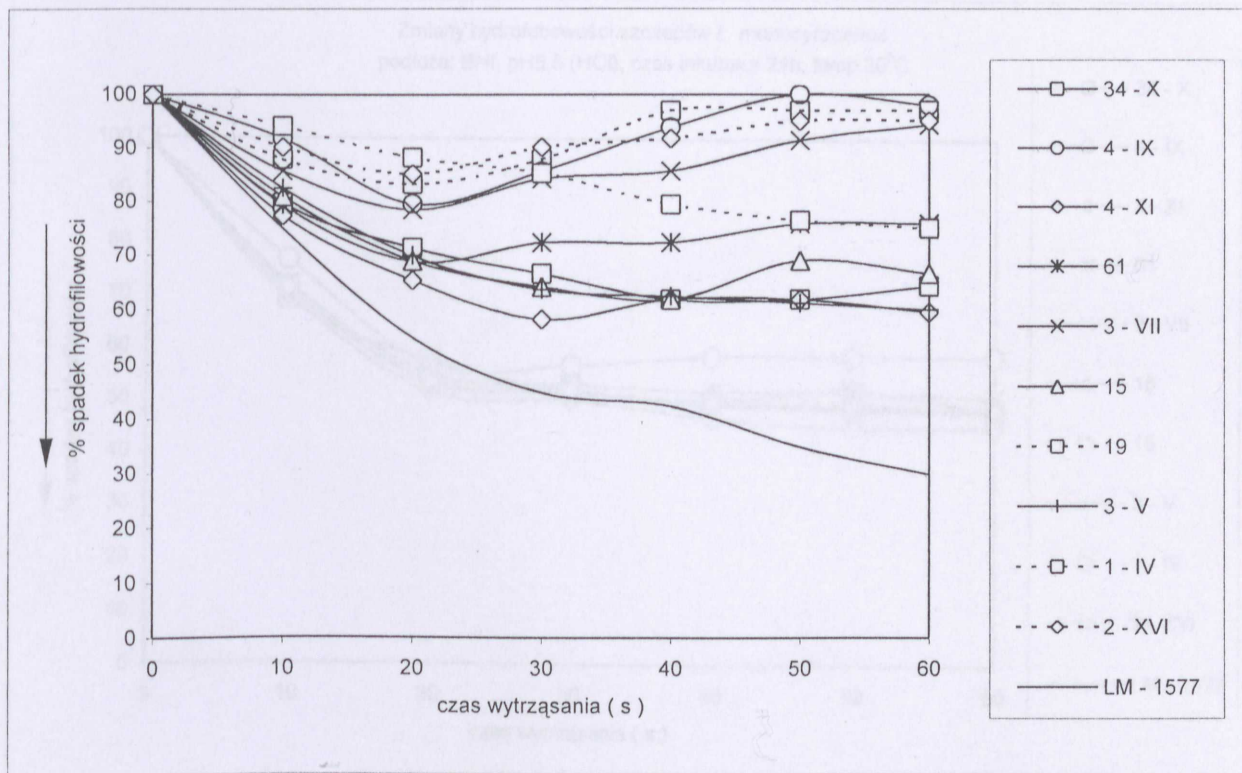
Ryc. 7. Hydrofobowość i dendrogram podobieństwa szczepów *L. monocytogenes* hodowanych na podłożu BHI stałym. Czas inkubacji 24h, temperatura inkubacji 30⁰C.



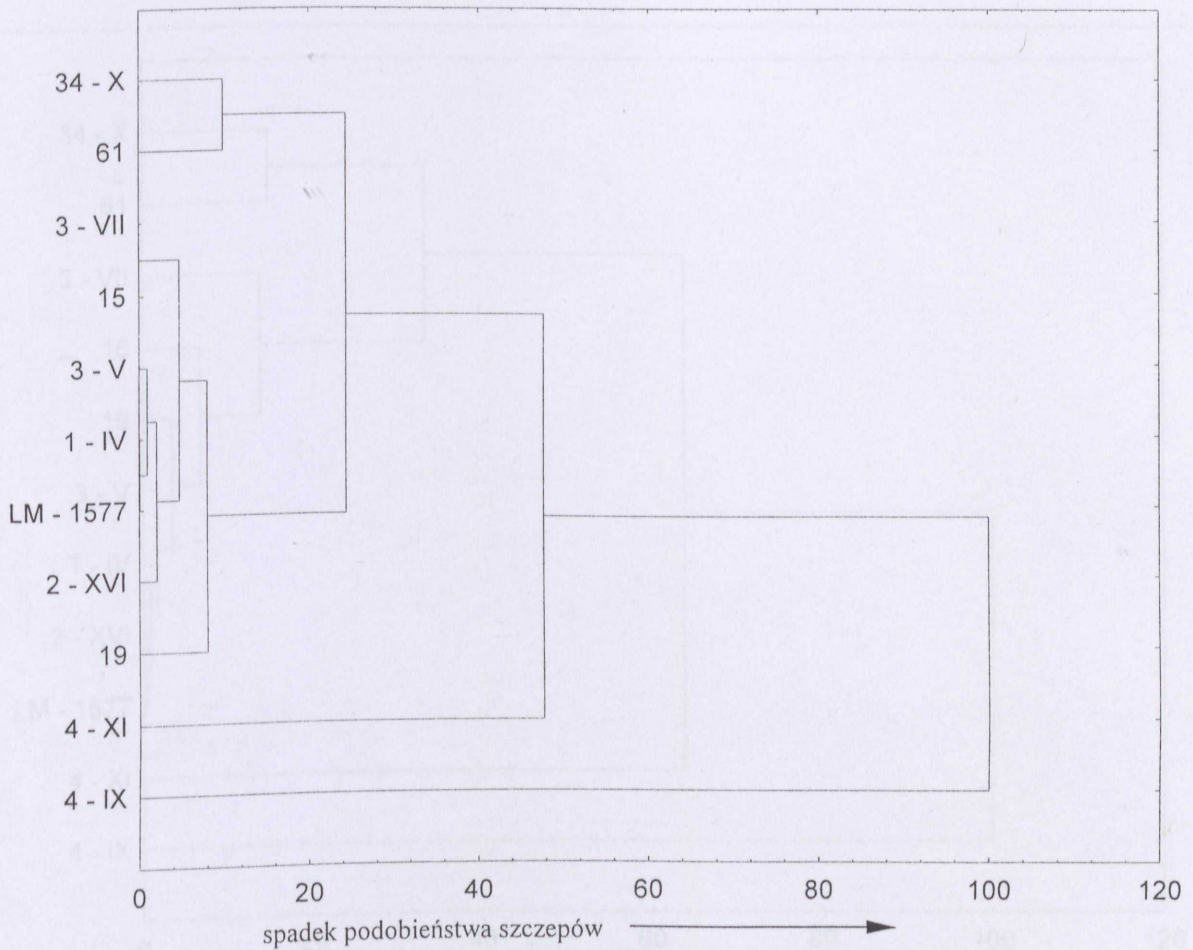
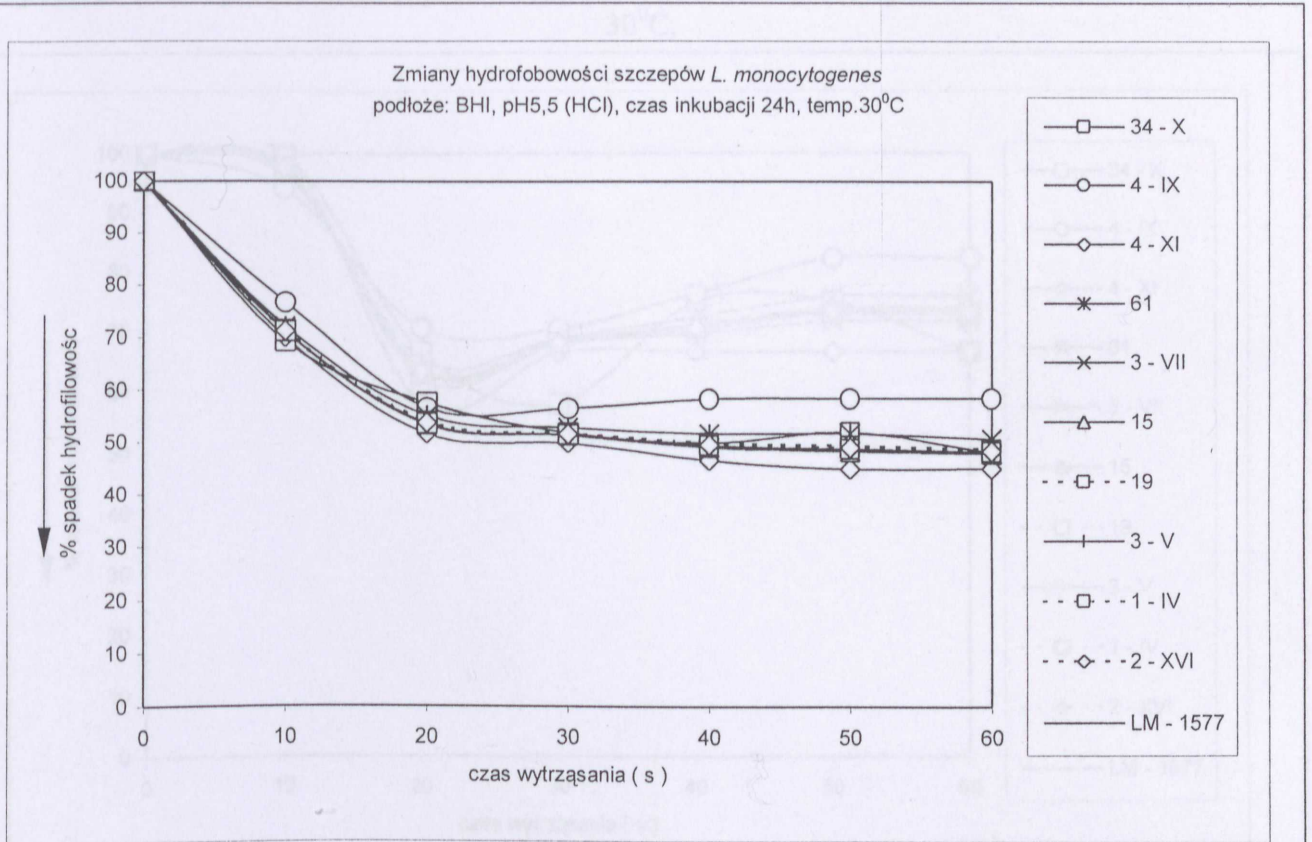
Ryc. 8. Hydrofobowość i dendrogram podobieństwa szczepów *L. monocytogenes* hodowanych na agarze cukrowym. Czas inkubacji 24h, temperatura inkubacji 30⁰C.



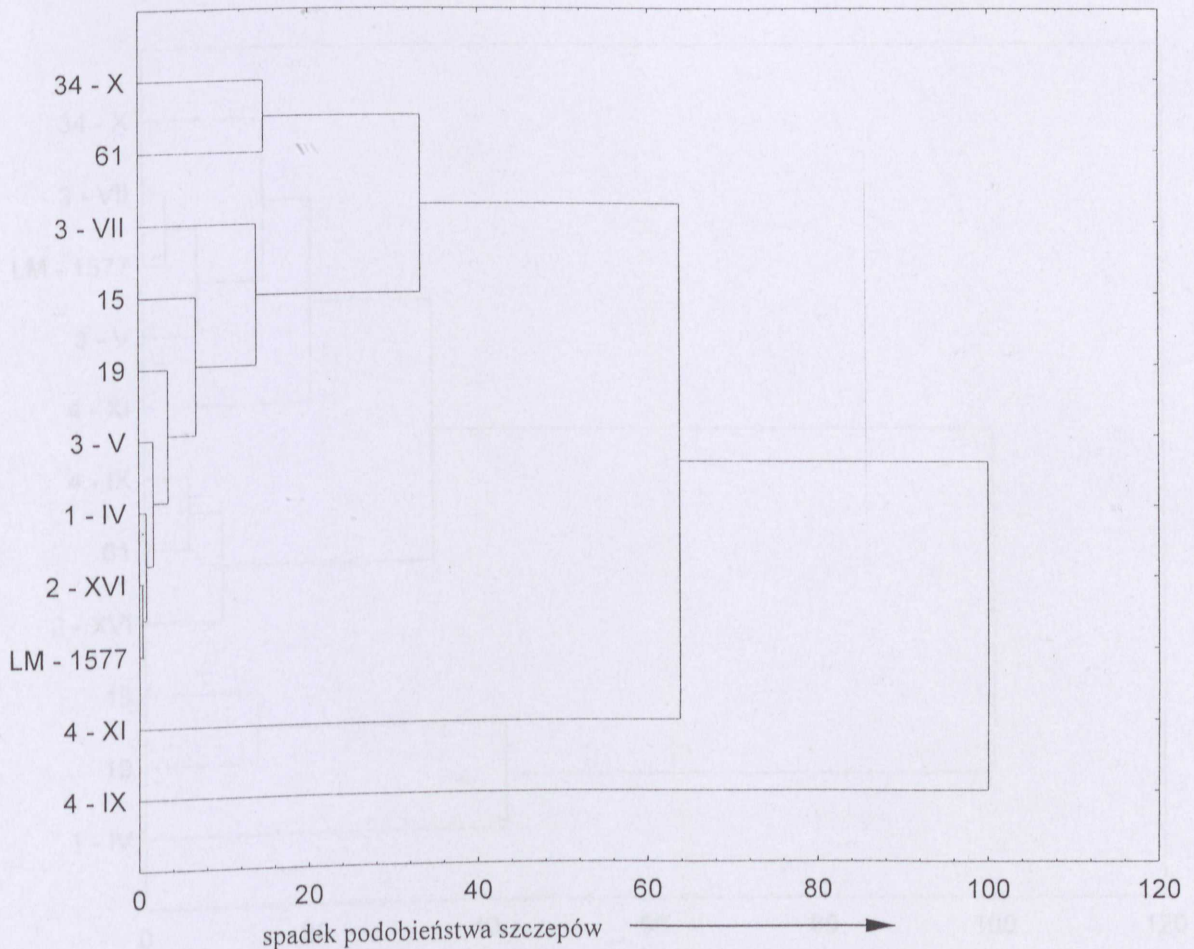
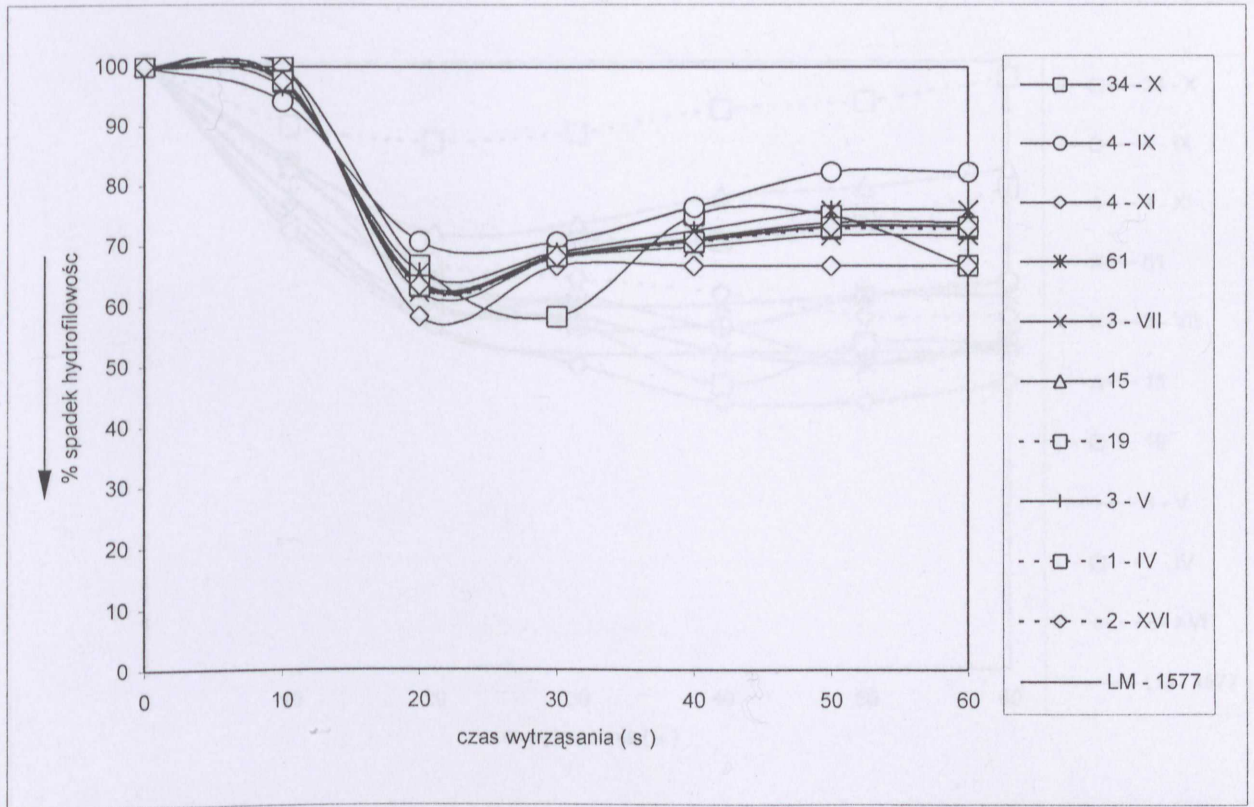
Ryc. 9. Hydrofobowość i dendrogram podobieństwa szczepów *L. monocytogenes* hodowanych na agarze zwykłym. Czas inkubacji 24h, temperatura inkubacji 30°C.



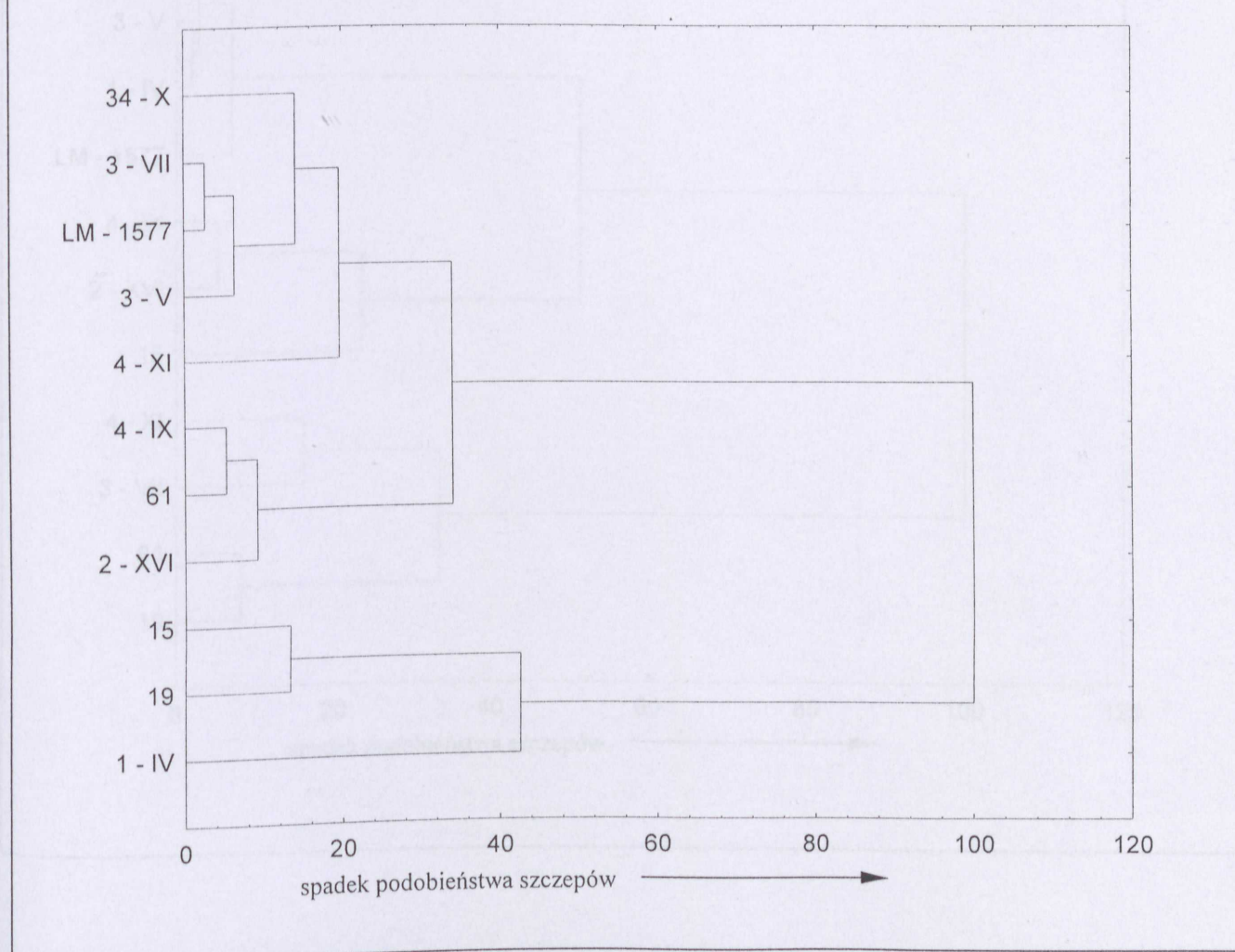
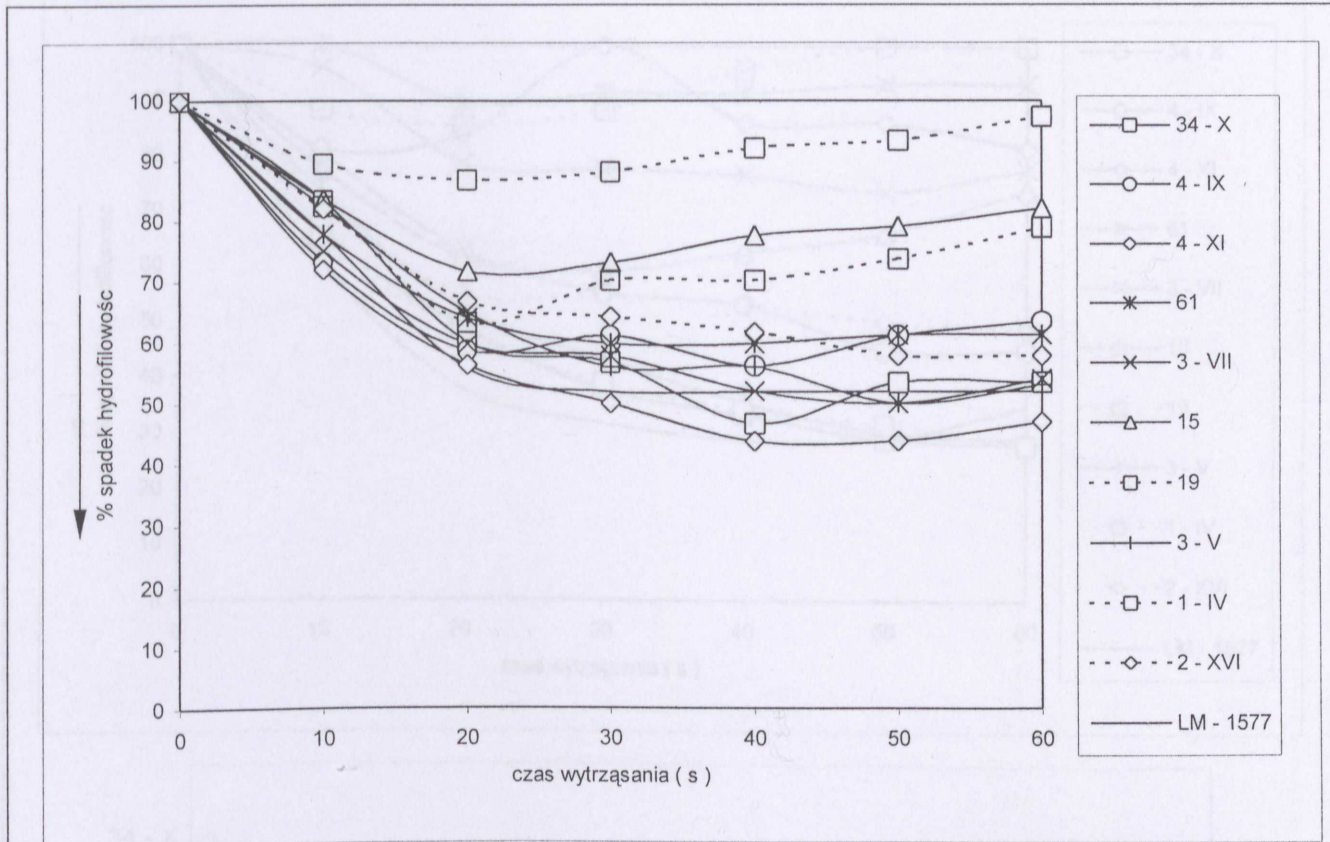
Ryc.10. Hydrofobowość i dendrogram podobieństwa szczepów *L. monocytogenes* hodowanych na podłożu BHI obniżonym do pH 5,5 HCl. Czas inkubacji 24h, temperatura inkubacji 30°C.



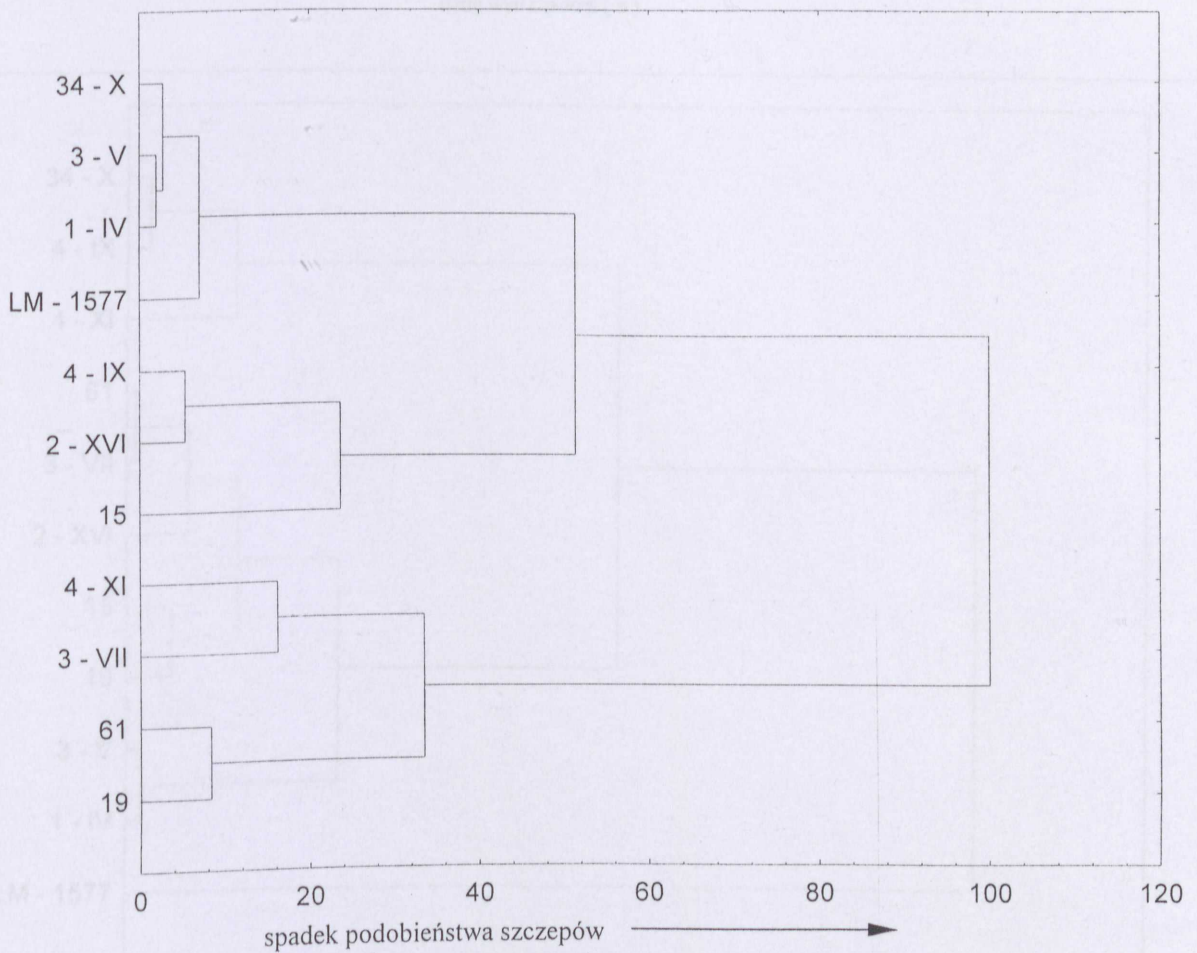
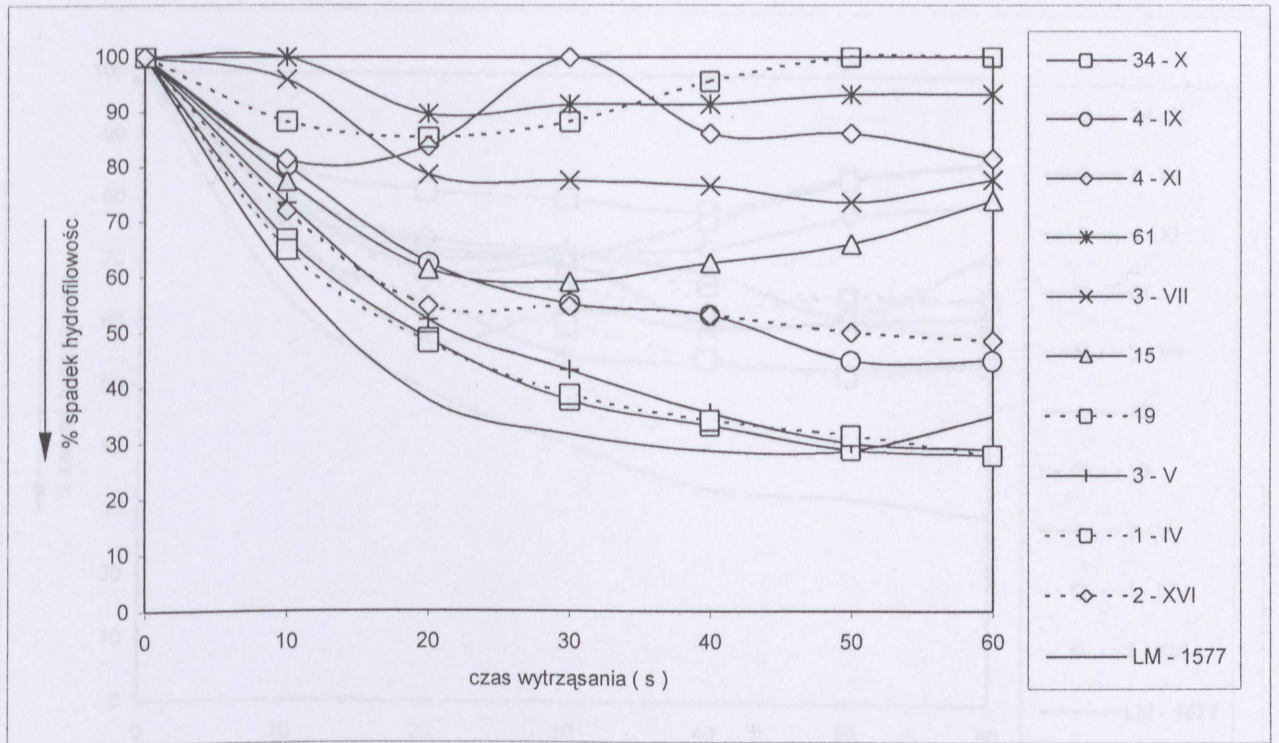
Ryc. 11. Hydrofobowość i dendrogram podobieństwa szczepów *L. monocytogenes* hodowanych na podłożu BHI o pH 5,5 obniżonym kwasem octowym. Czas inkubacji 24h, temperatura inkubacji 30°C.



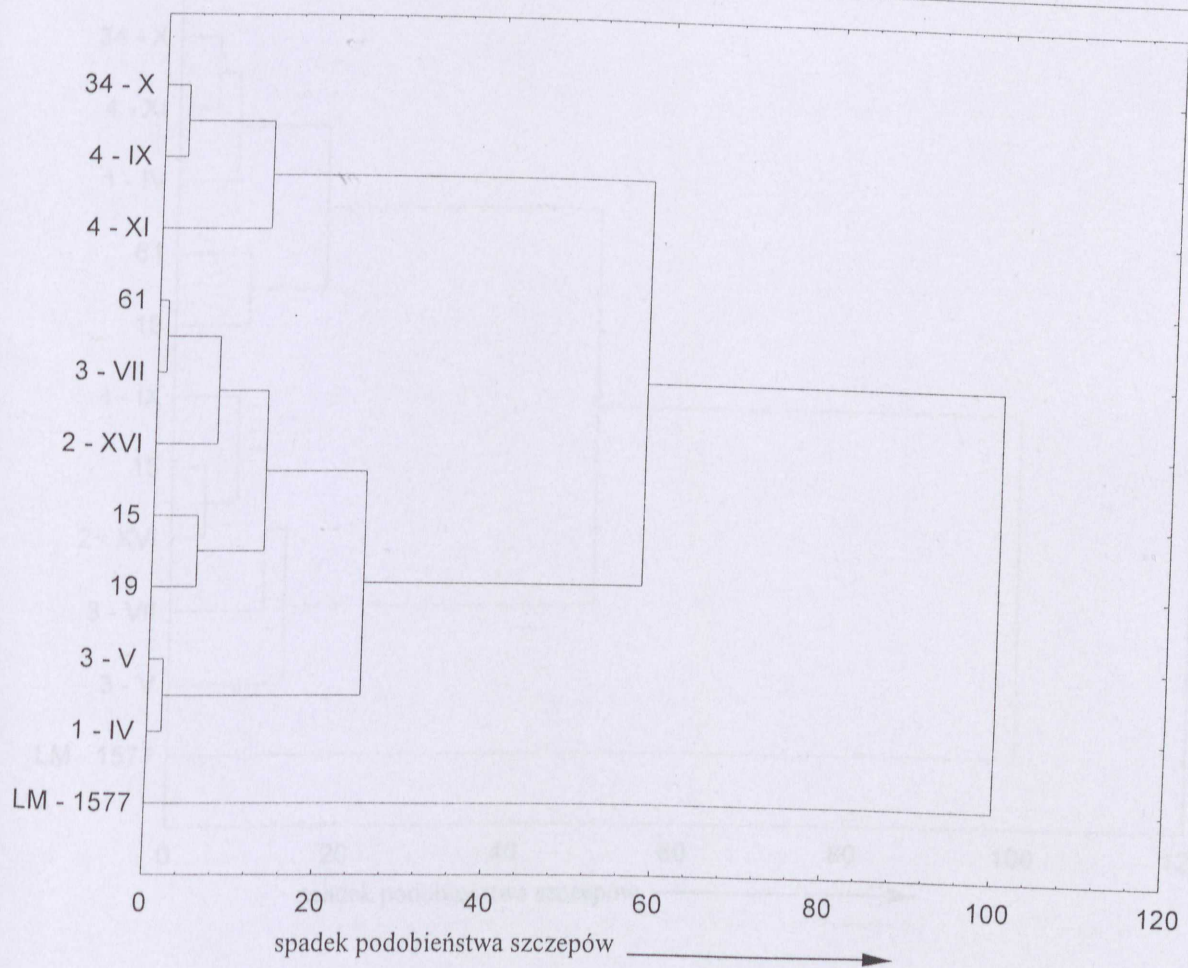
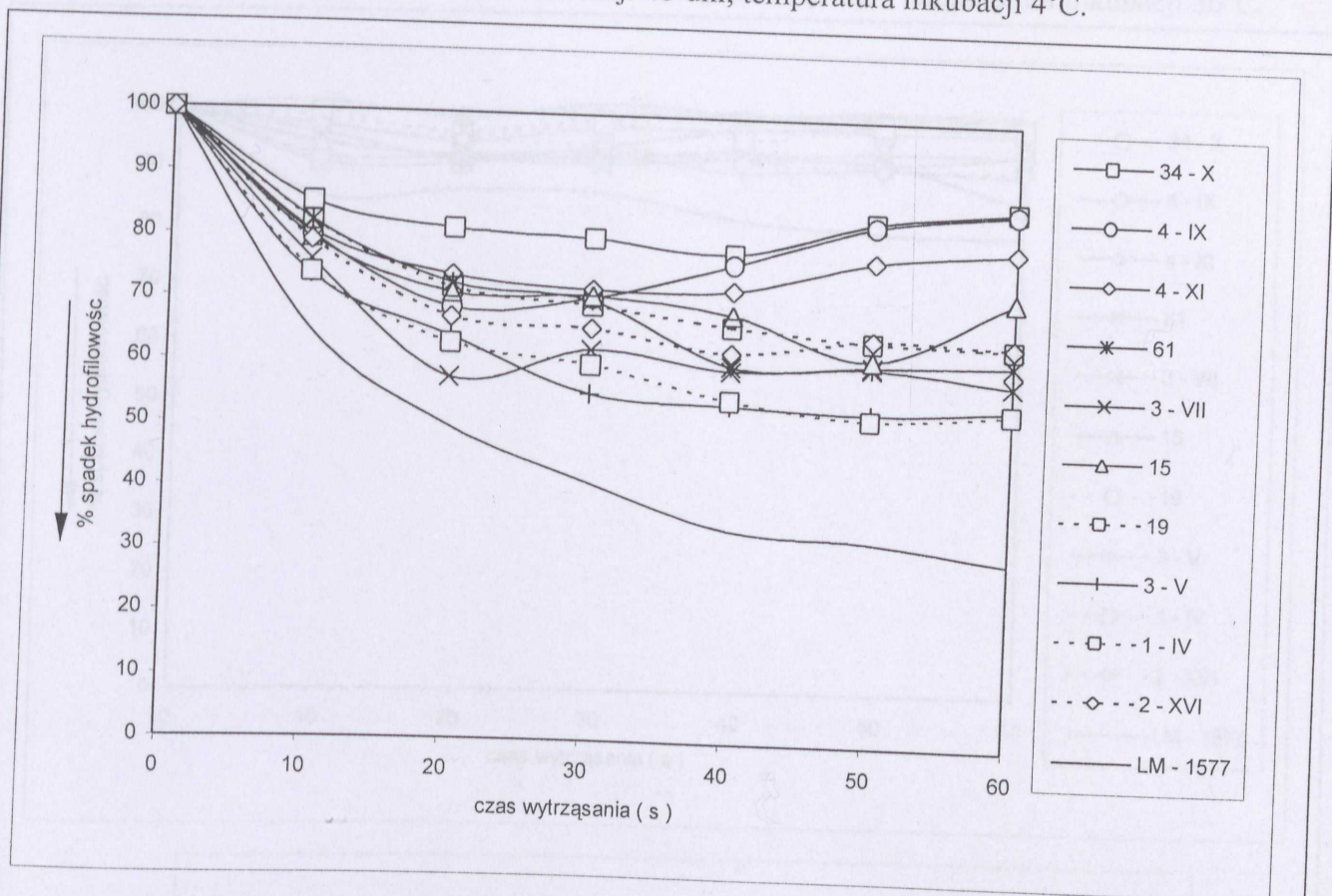
Ryc. 12. Hydrofobowość i dendrogram podobieństwa szczepów *L. monocytogenes* hodowanych na podłożu BHI o pH 5,5 obniżonym kwasem mlekowym. Czas inkubacji 24h, temperatura inkubacji 30°C.



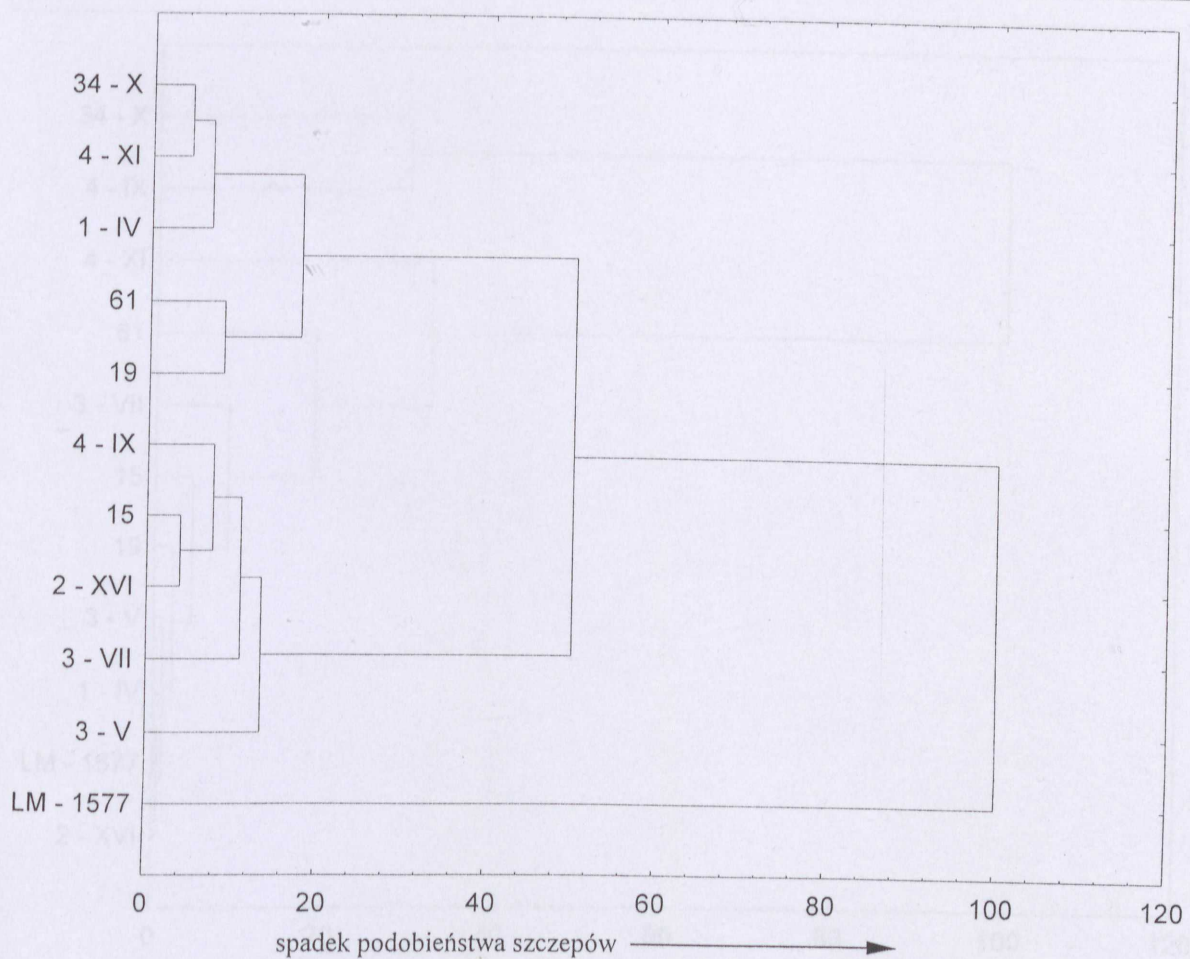
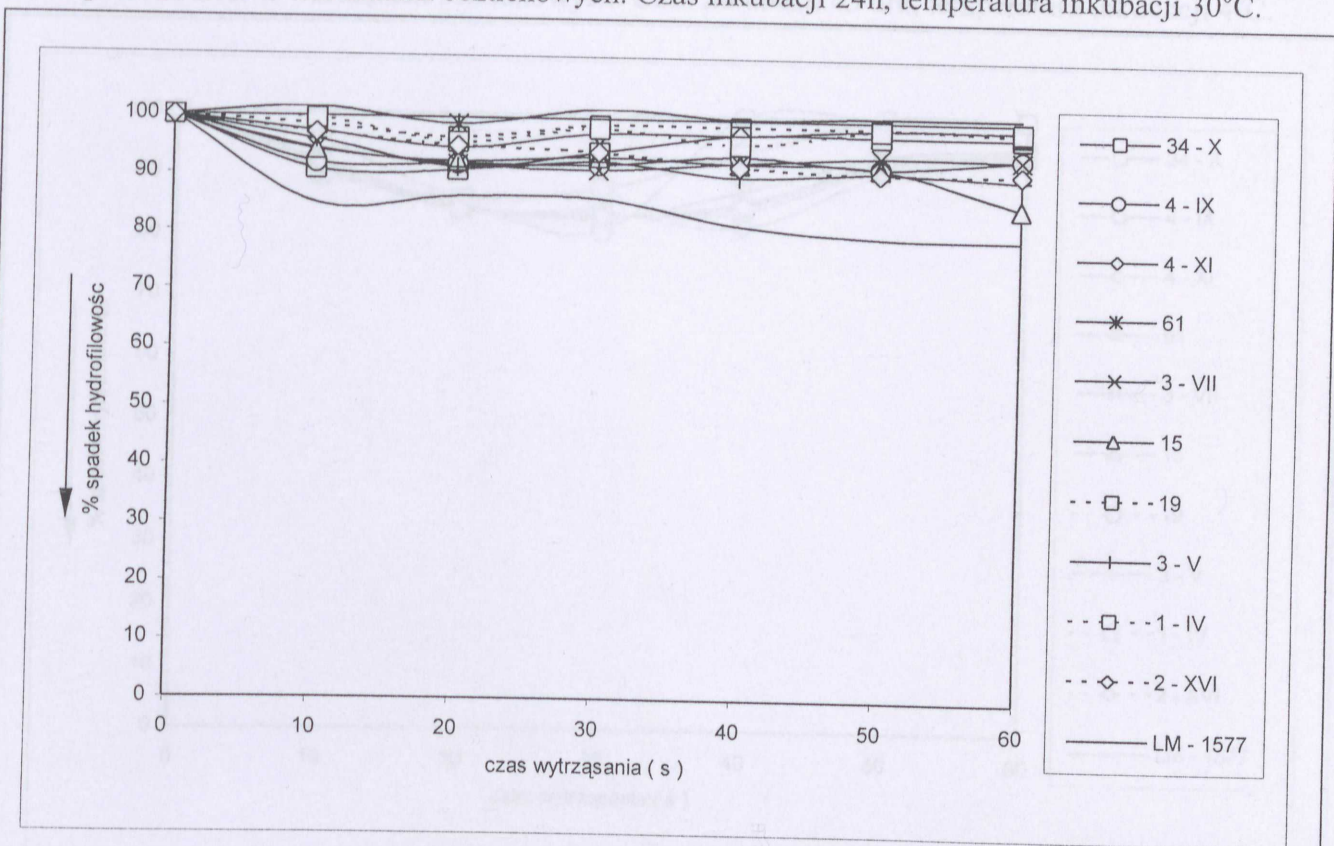
Ryc. 13. Hydrofobowość i dendrogram podobieństwa szczepów *L. monocytogenes* hodowanych na podłożu BHI z 8% dodatkiem NaCl. Czas inkubacji 24h, temperatura inkubacji 30°C.



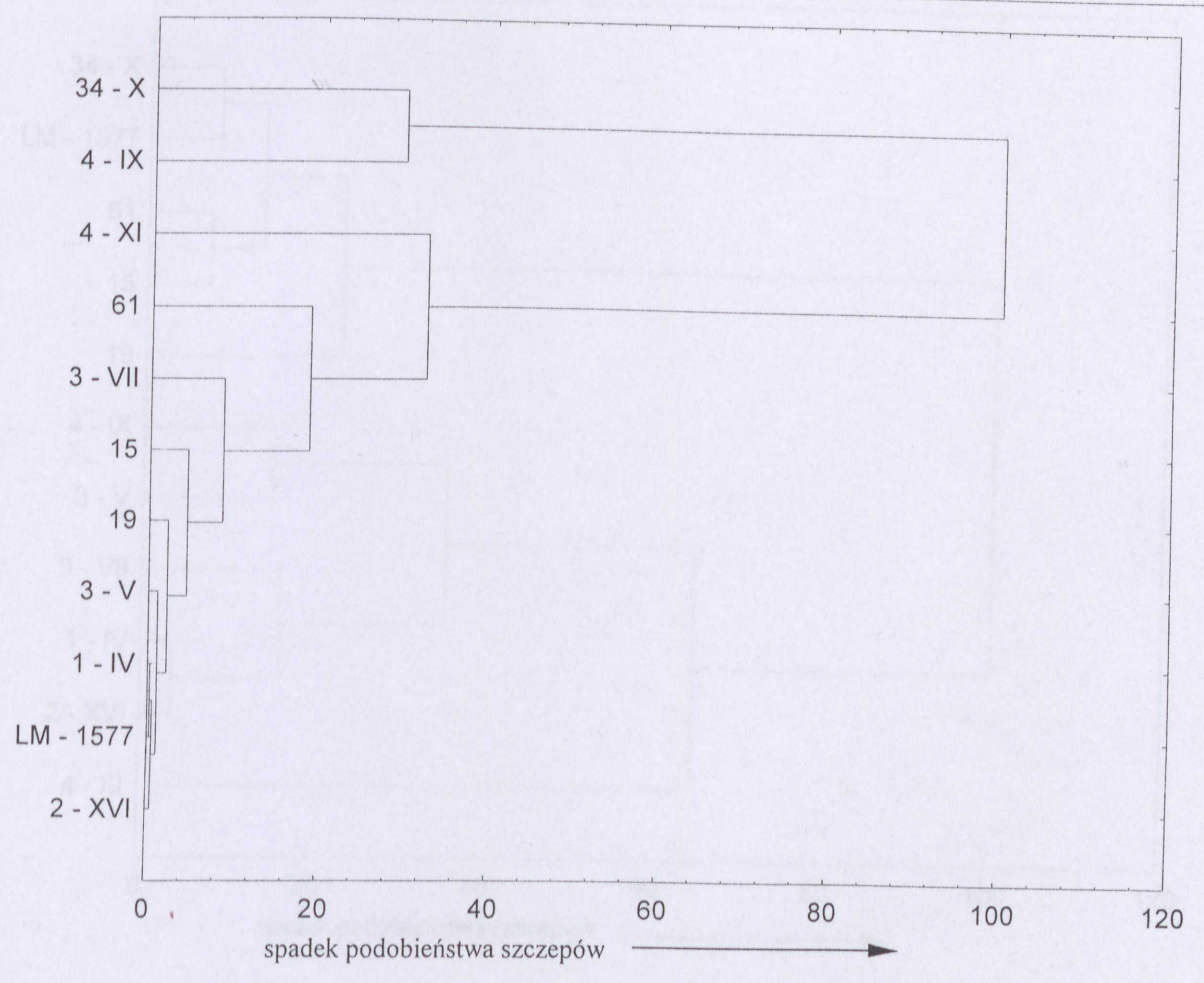
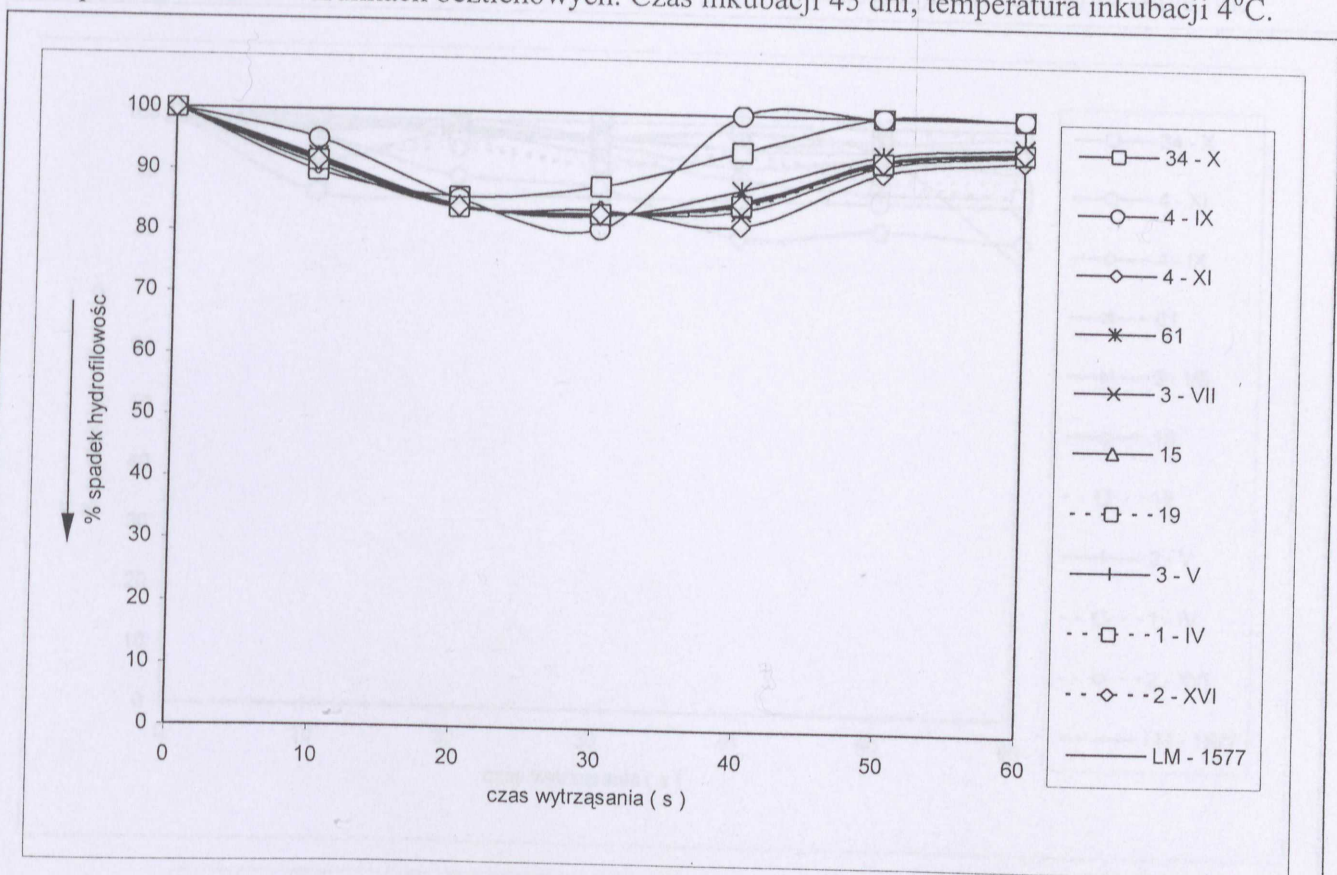
Ryc.14. Hydrofobowość i dendrogram podobieństwa szczepów *L. monocytogenes* hodowanych na podłożu BHI. Czas inkubacji 45 dni, temperatura inkubacji 4°C.



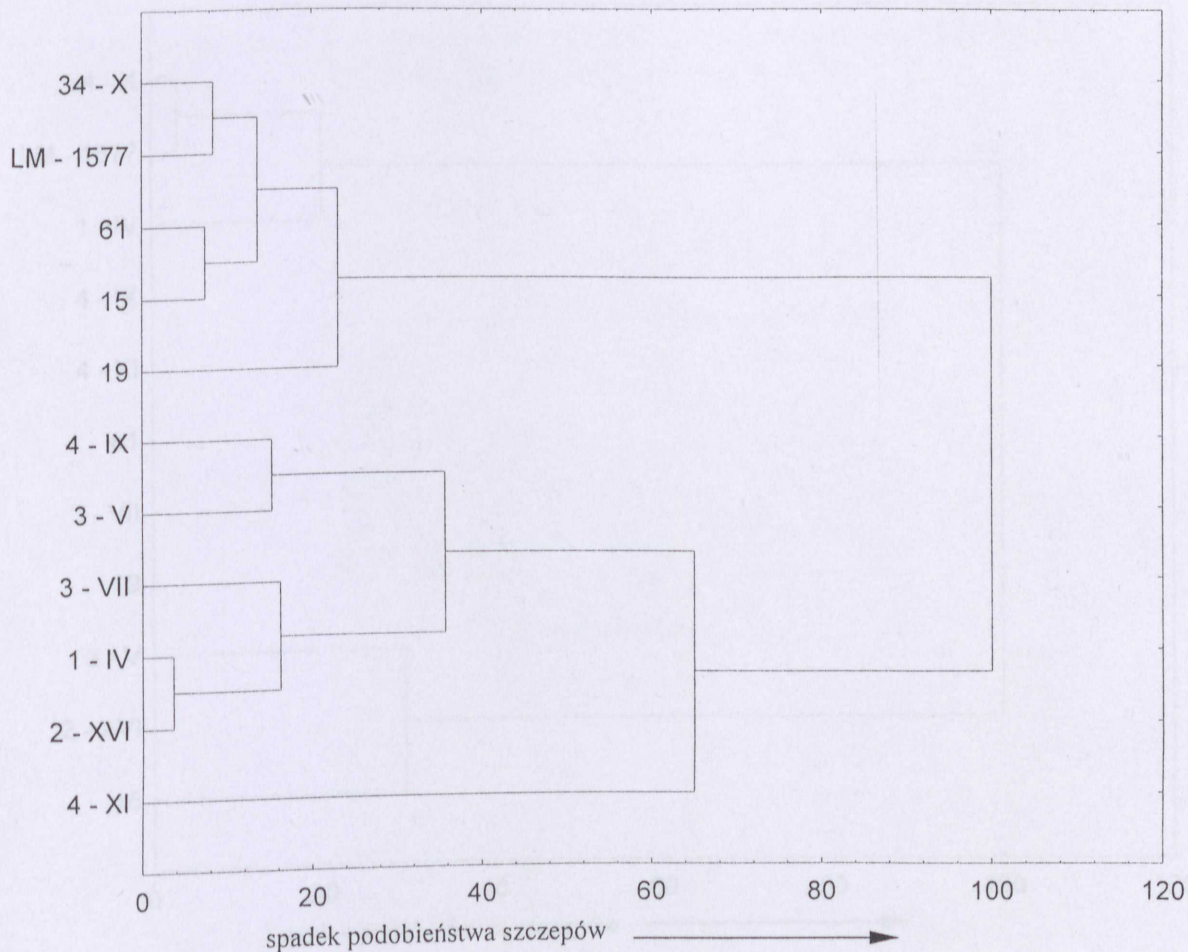
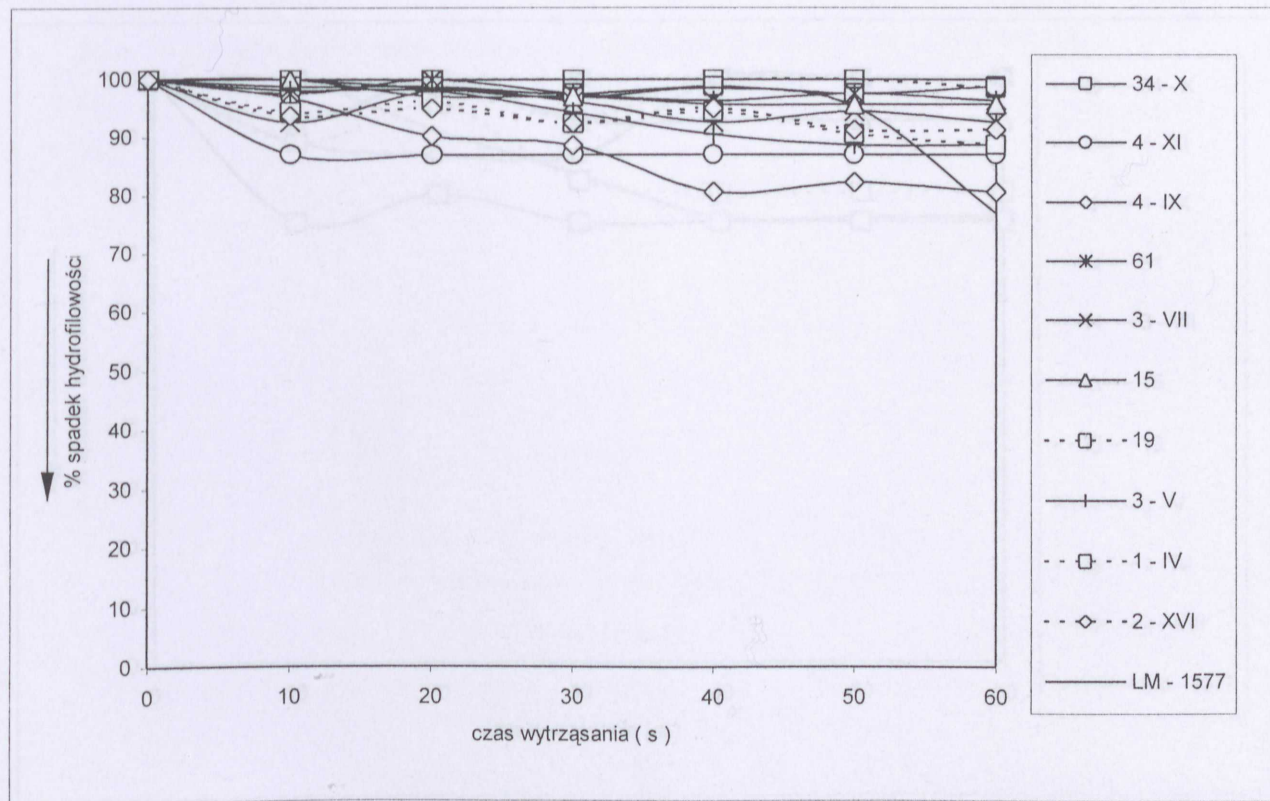
Ryc.15. Hydrofobowość i dendrogram podobieństwa szczepów *L. monocytogenes* hodowanych na podłożu BHI w warunkach beztlenowych. Czas inkubacji 24h, temperatura inkubacji 30⁰C.



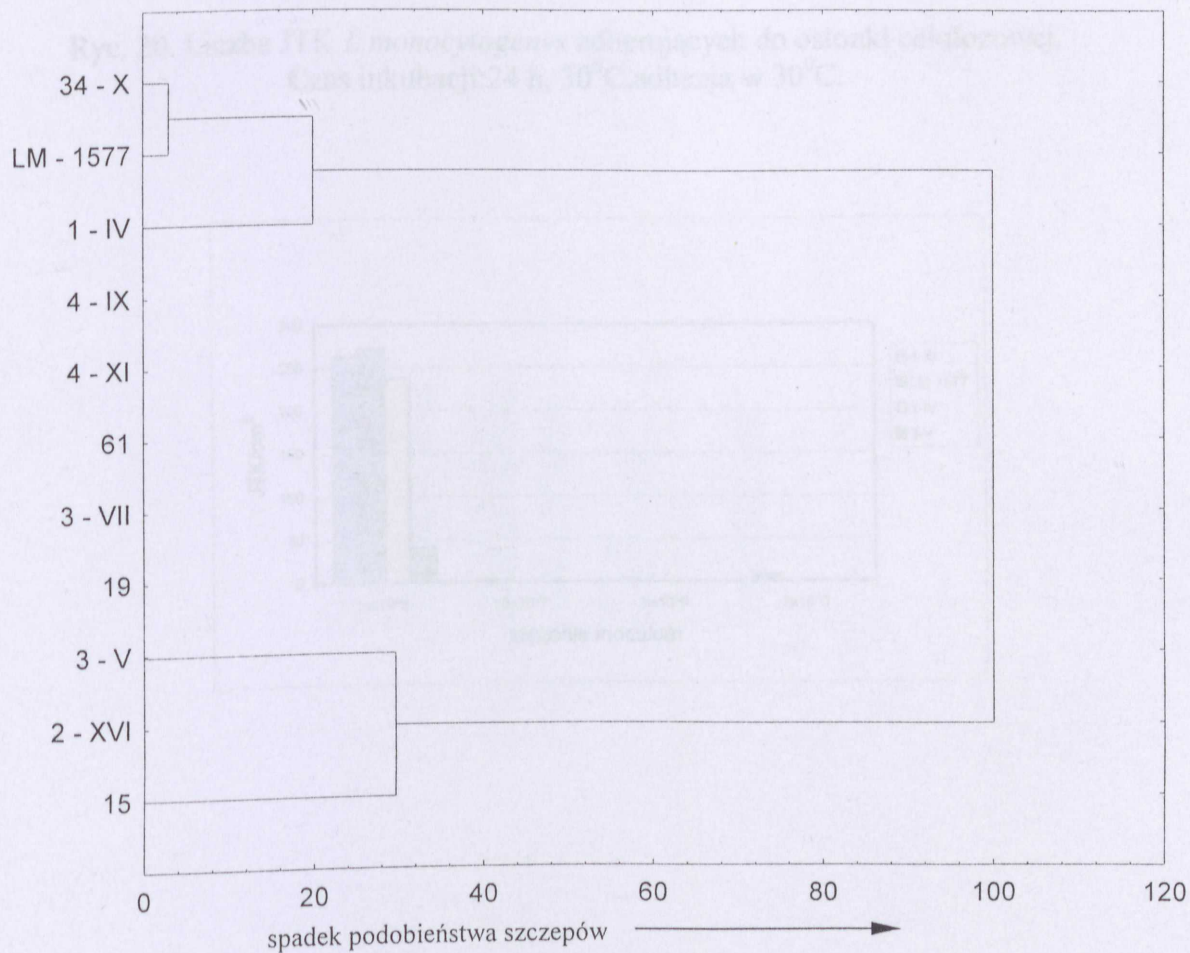
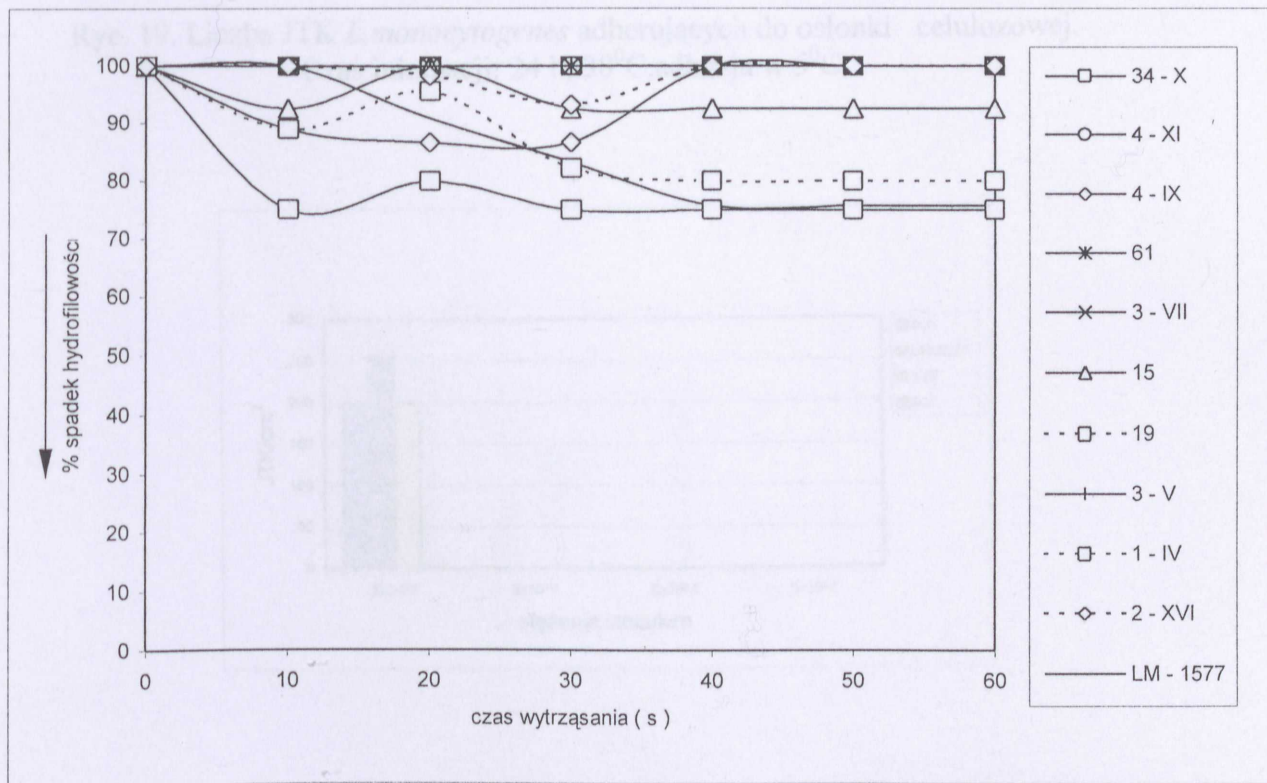
Ryc.16. Hydrofobowość i dendrogram podobieństwa szczepów *L. monocytogenes* hodowanych na podłożu BHI w warunkach beztlenowych. Czas inkubacji 45 dni, temperatura inkubacji 4°C.



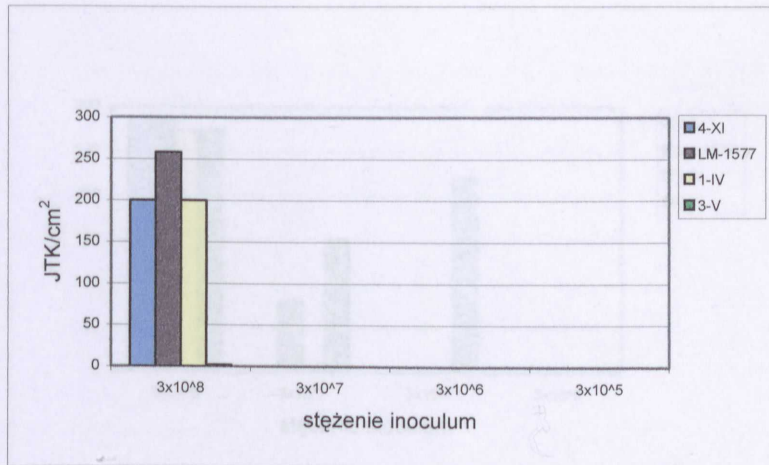
Ryc. 17. Adhezyjność do oleju roślinnego szczepów *L. monocytogenes* hodowanych na podłożu BHI. Czas inkubacji 24h, temperatura inkubacji 30⁰C, substancja hydrofobowa olive oil.



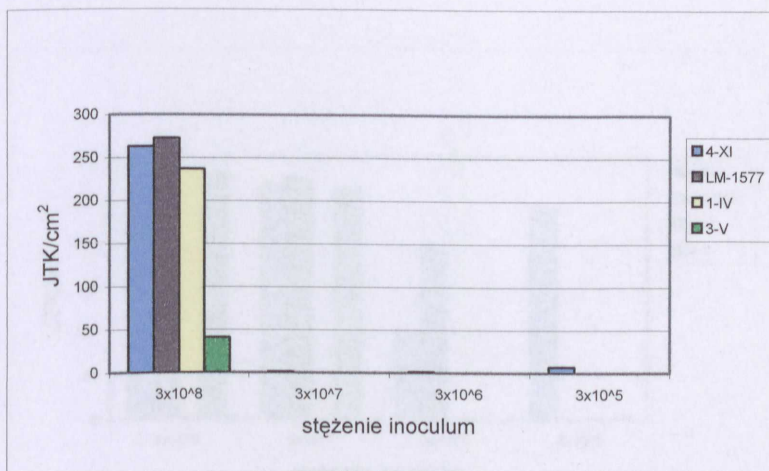
Ryc.18. Adhezyjność do oleju roślinnego szczepów *L. monocytogenes* hodowanych na podłożu BHI. Czas inkubacji 45 dni, temperatura inkubacji 4°C, substancja hydrofobowa olive oil.



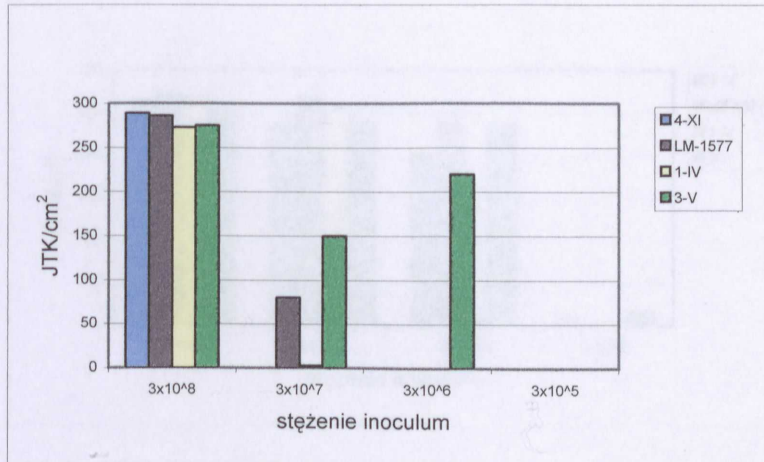
Ryc. 19. Liczba JTK *L.monocytogenes* adherujących do osłonki celulozowej.
 Czas inkubacji: 24 h, 30⁰C, adhezja w 5⁰C.



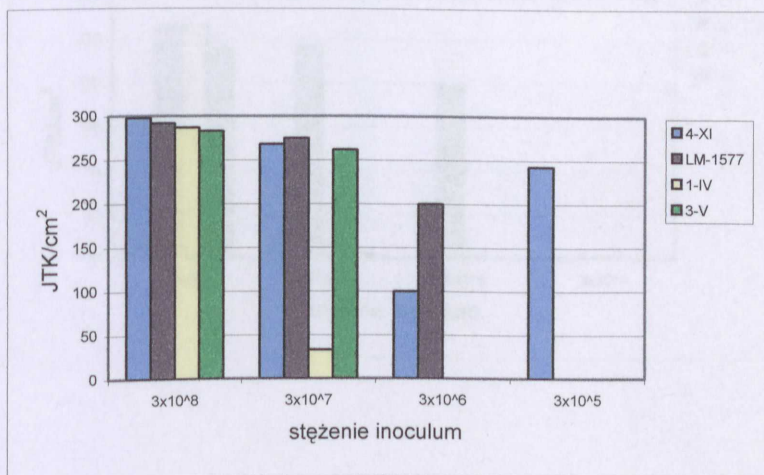
Ryc. 20. Liczba JTK *L.monocytogenes* adherujących do osłonki celulozowej.
 Czas inkubacji:24 h, 30⁰C, adhezja w 30⁰C.



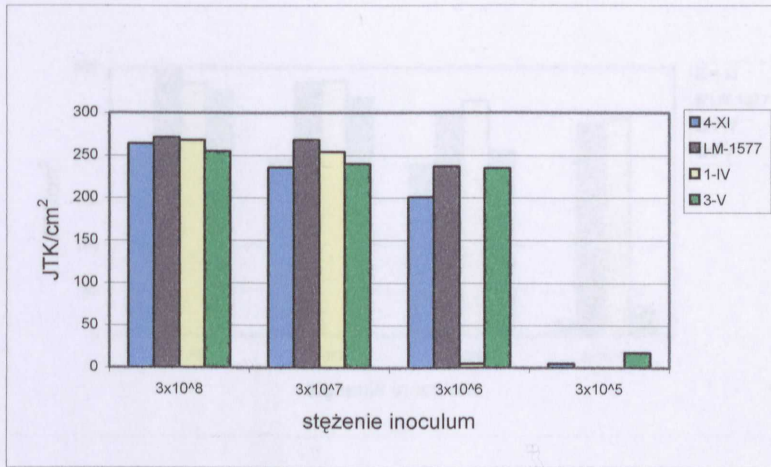
Ryc. 21. Liczba JTK *L.monocytogenes* adherujących do osłonki kolagenowej.
Czas inkubacji:24 h, 30⁰C, adhezja w 5⁰C.



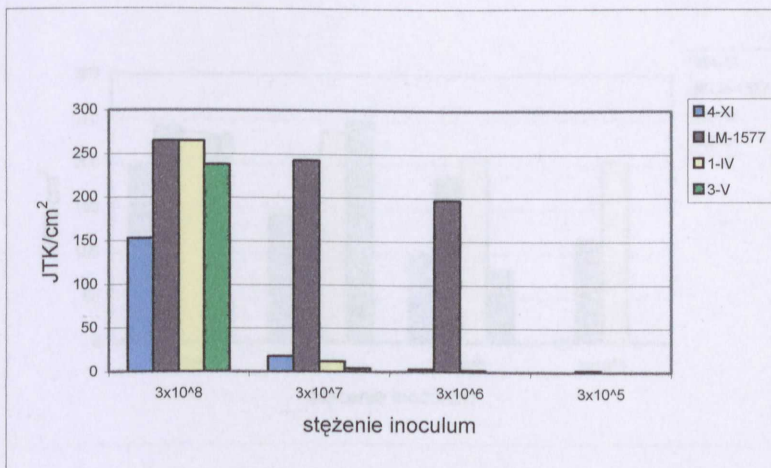
Ryc. 22. Liczba JTK *L.monocytogenes* adherujących do osłonki kolagenowej.
Czas inkubacji:24 h, 30⁰C, adhezja w 30⁰C.



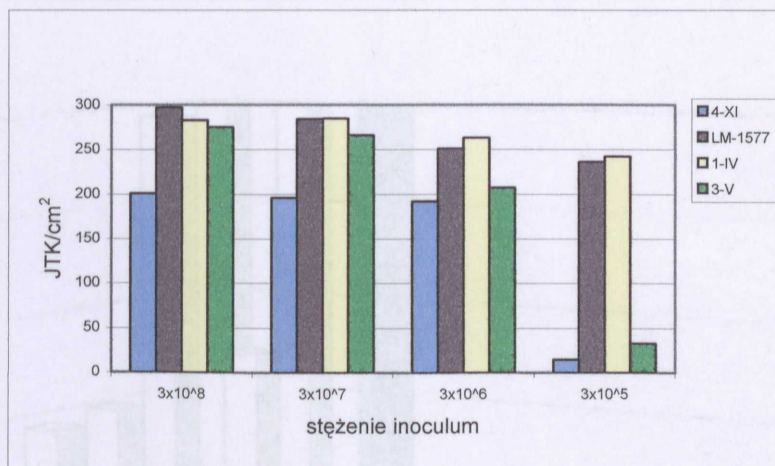
Ryc. 23. Liczba JTK *L.monocytogenes* adherujących do osłonki celulozowej.
 Czas inkubacji: 45 dni, 5⁰C, adhezja w 5⁰C.



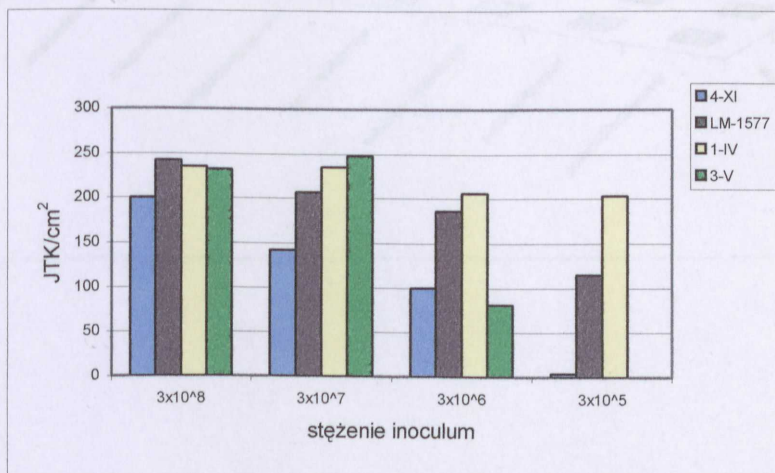
Ryc. 24. Liczba JTK *L.monocytogenes* adherujących do osłonki celulozowej.
 Czas inkubacji:45 dni, 5⁰C, adhezja w 37⁰C.



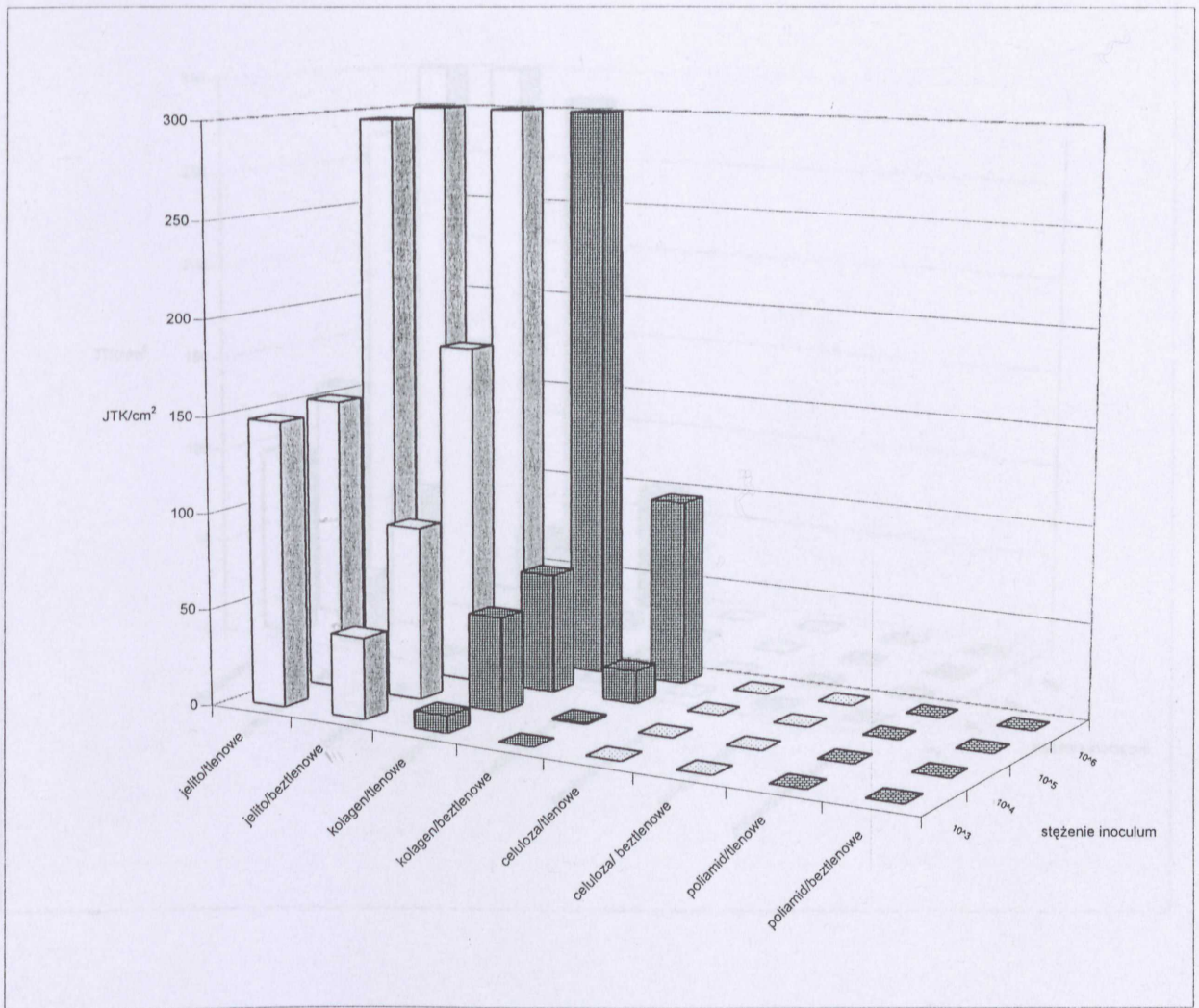
Ryc. 25. Liczba JTK *L.monocytogenes* adherujących do osłonki kolagenowej.
Czas inkubacji: 45 dni, 5⁰C, adhezja w 5⁰C.



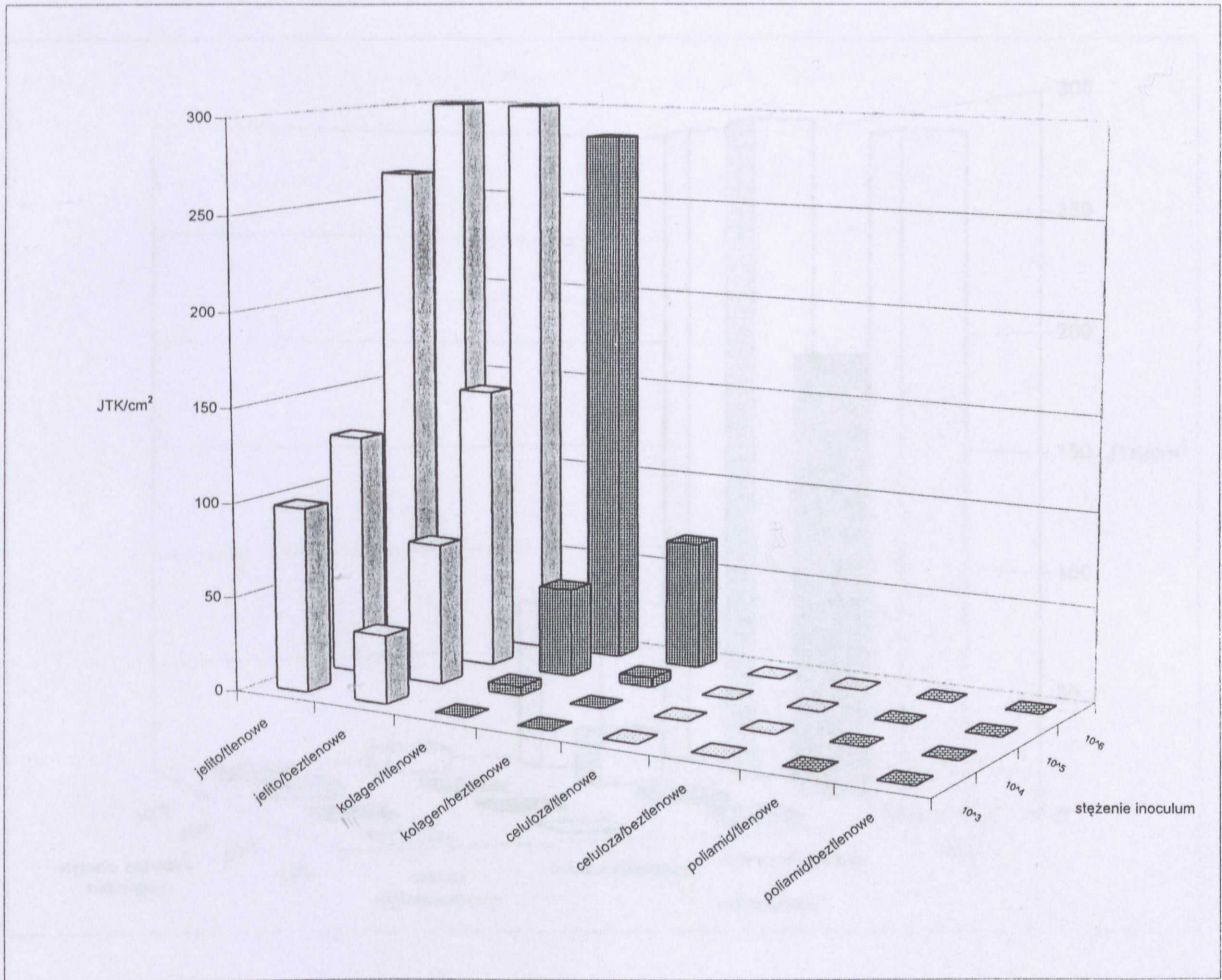
Ryc. 26. Liczba JTK *L.monocytogenes* adherujących osłonki kolagenowej.
Czas inkubacji: 45 dni, 5⁰C, adhezja w 37⁰C.



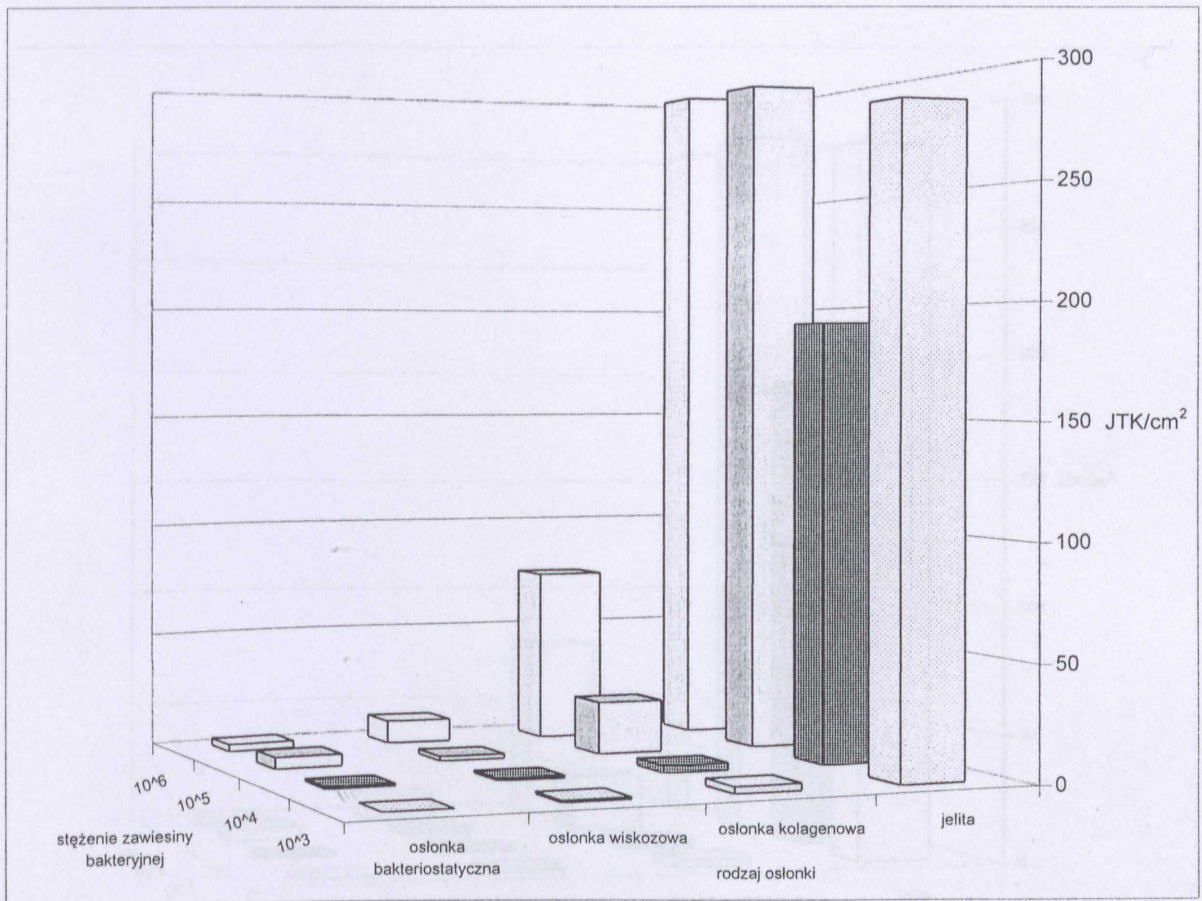
Ryc. 27. Adhezyjność szczepu LM-1577 *L. monocytogenes* inkubowanego w warunkach tlenowych i beztlenowych do poszczególnych typów osłonek.



Ryc. 28. Adhezyjność szczepu 1-IV *L. monocytogenes* inkubowanego w warunkach tlenowych i beztlenowych do poszczególnych typów osłonek.

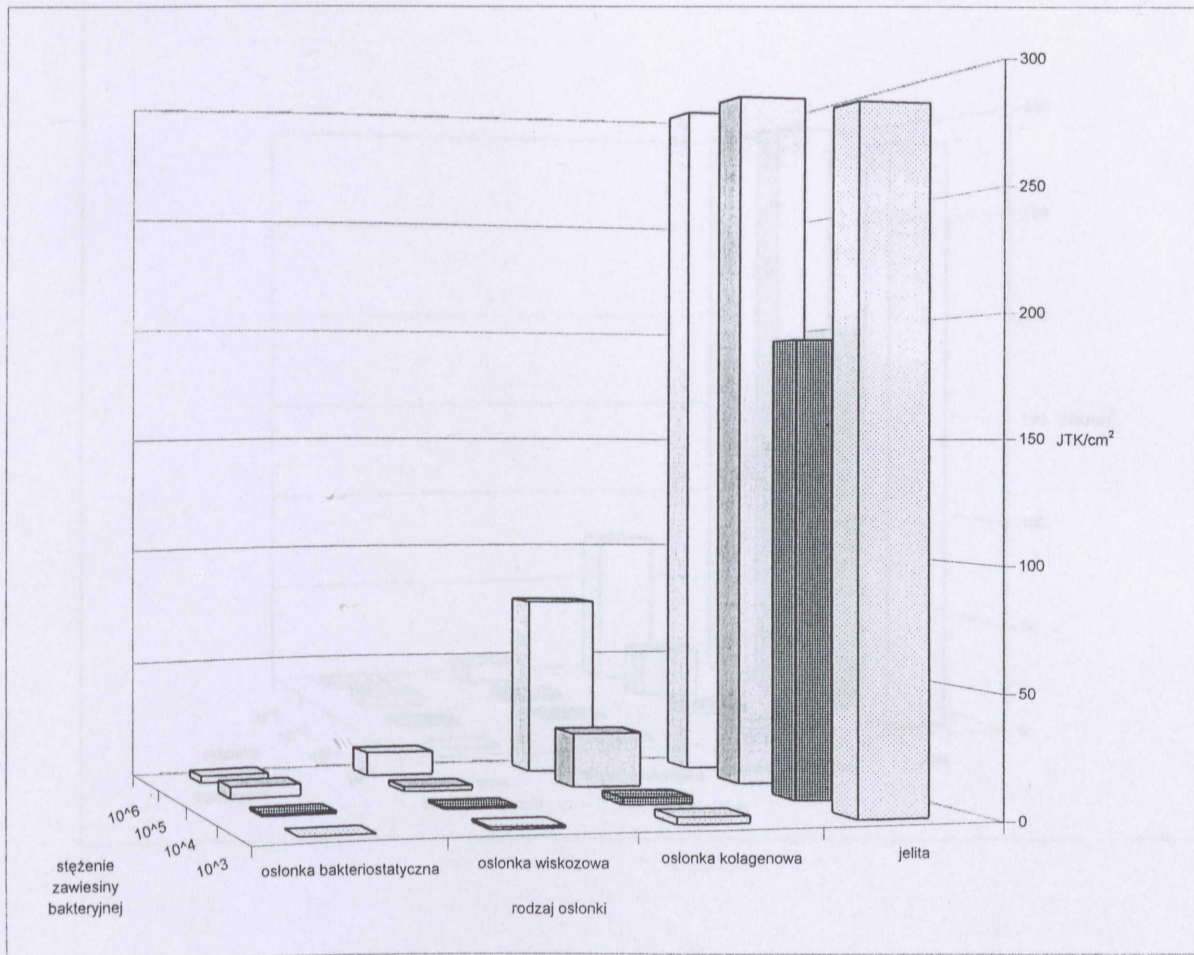


Ryc. 29. Adhezyjność szczepu 1-IV *Listeria monocytogenes* do poszczególnych typów osłonek nie powleczonych filmem tłuszczowym.

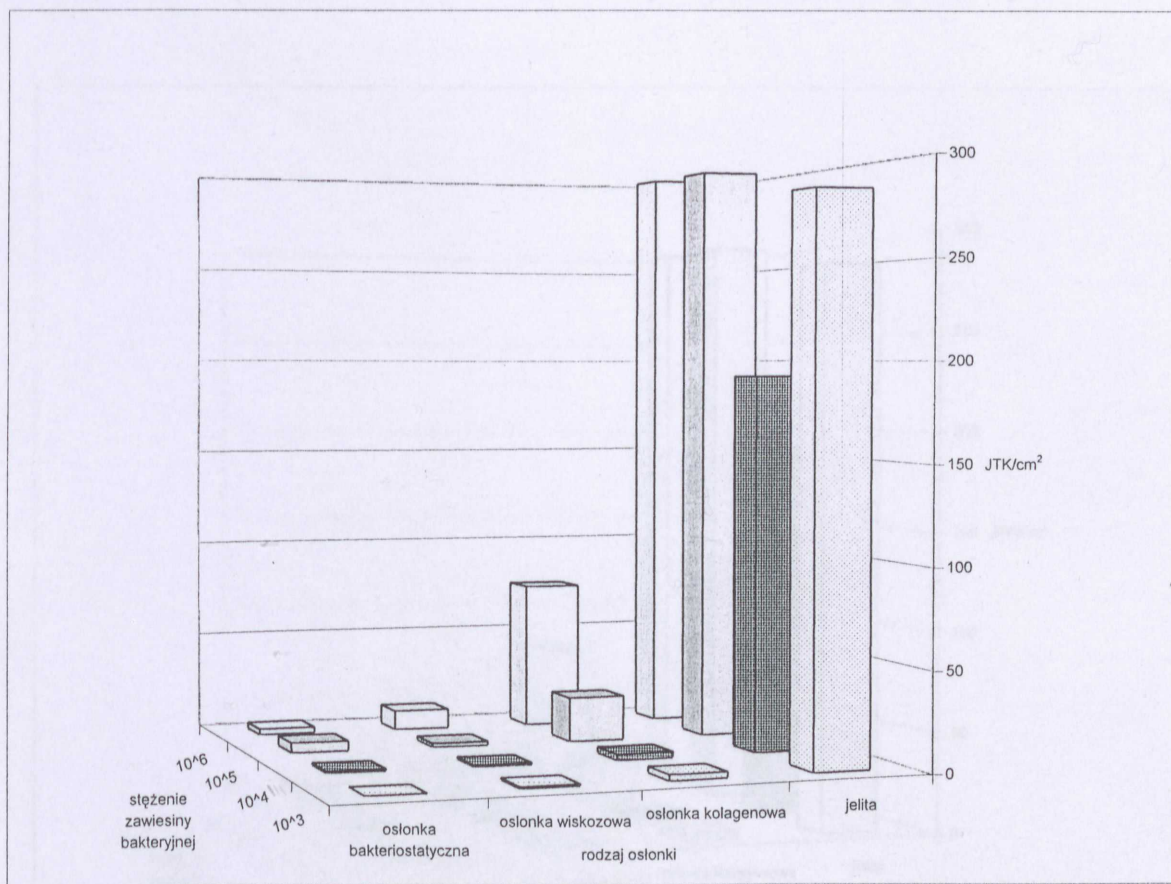


Ryc. 31. Adhezyjność szczepu 1-IV *Listeria monocytogenes* do poszczególnych typów

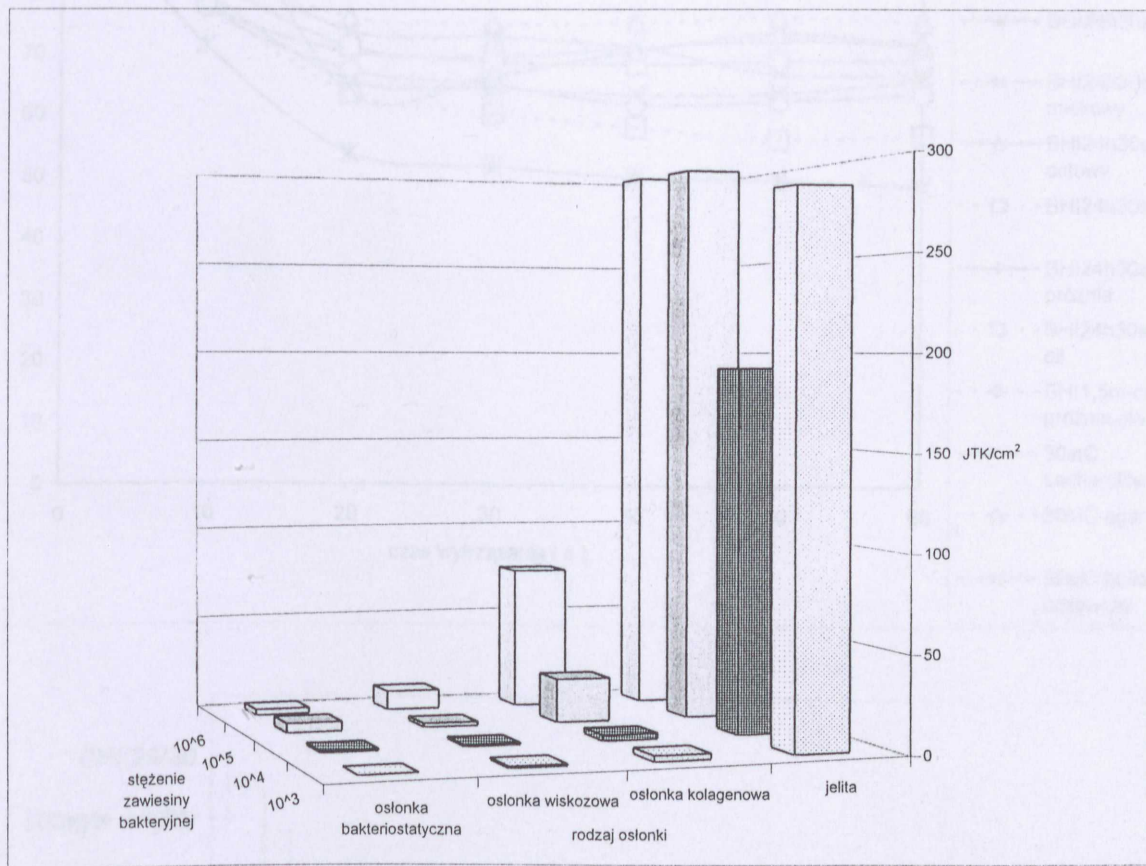
Ryc. 30. Adhezyjność szczepu 1-IV *Listeria monocytogenes* do poszczególnych typów osłonek powleczonych filmem z tłuszczu stałego.



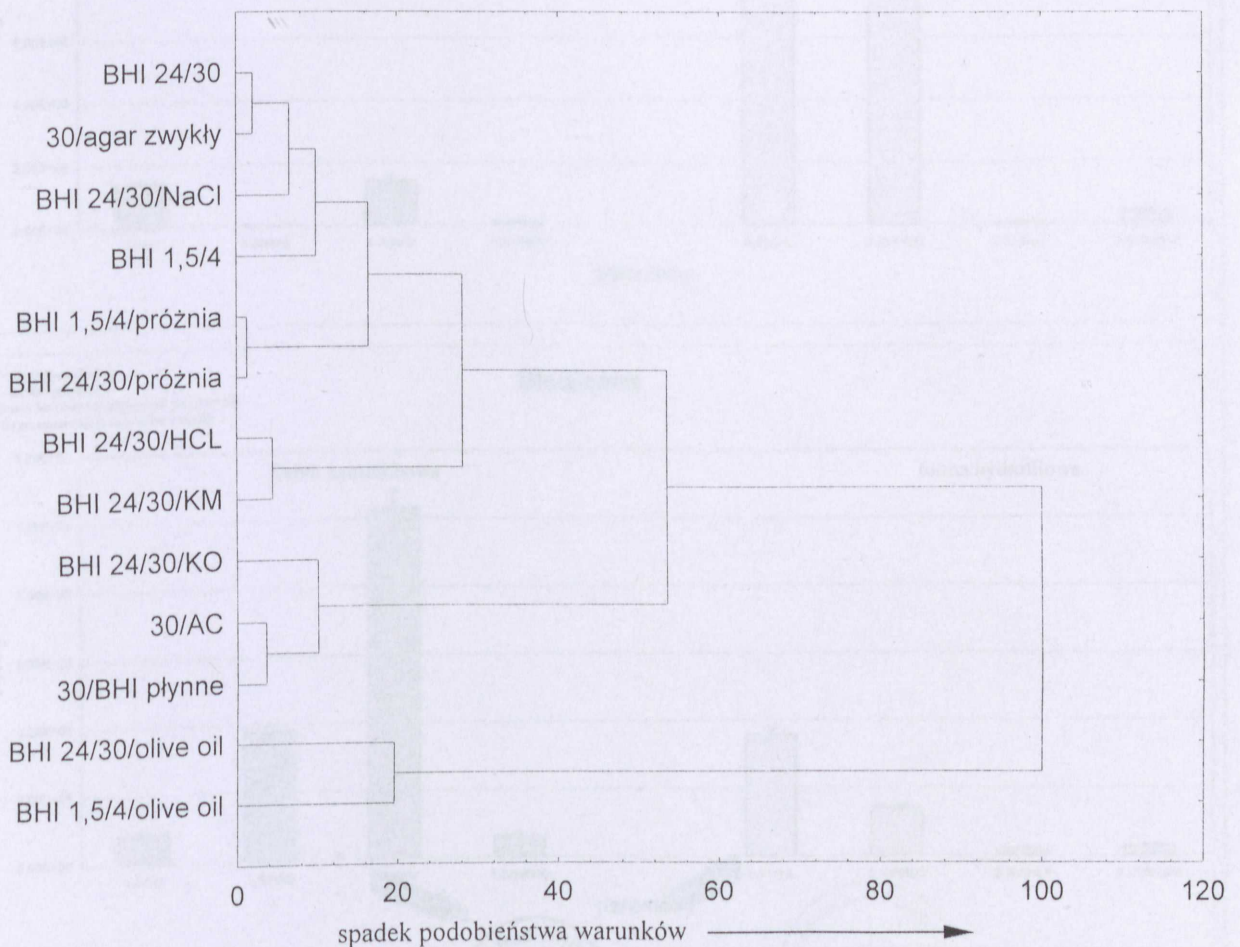
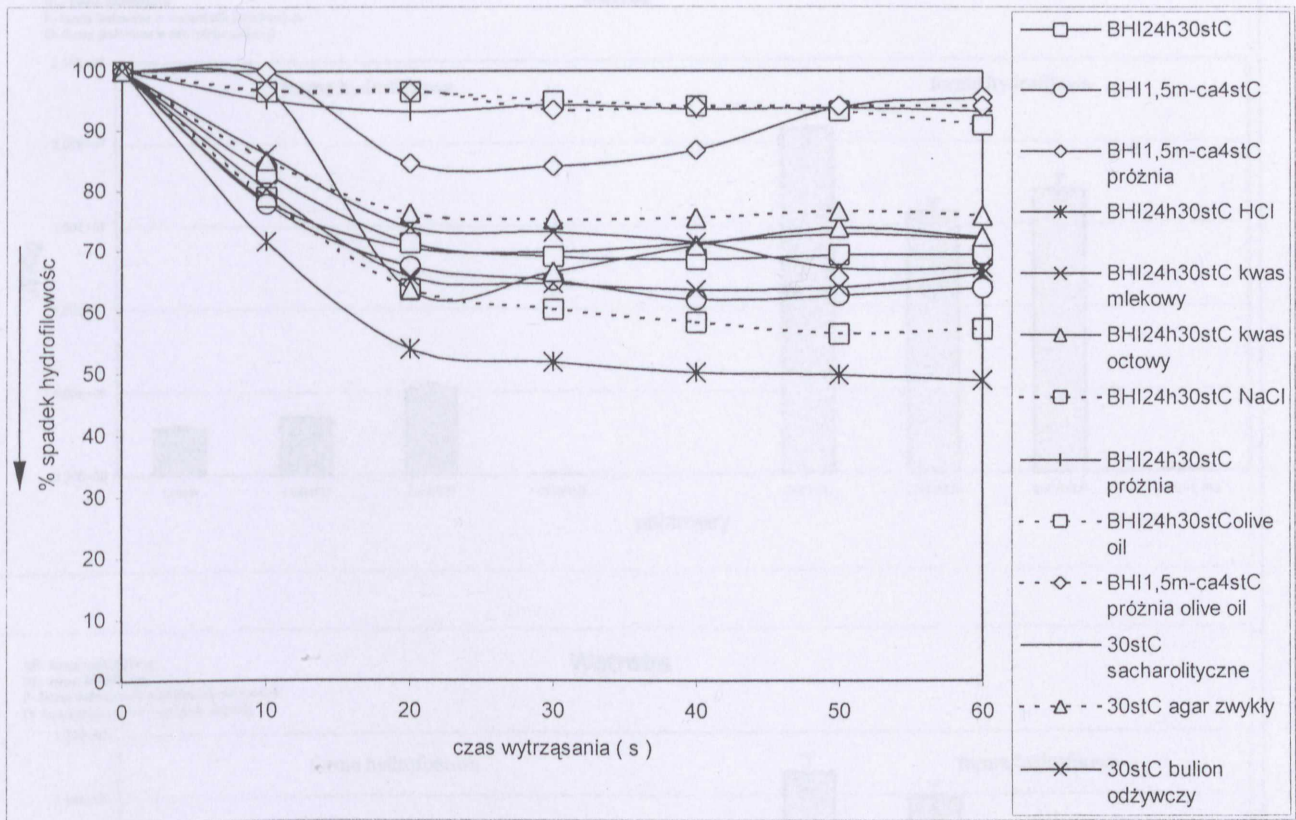
Ryc. 31. Adhezyjność szczepu 1-IV *Listeria monocytogenes* do poszczególnych typów osłonek powleczonych filmem z oleju z oliwek.



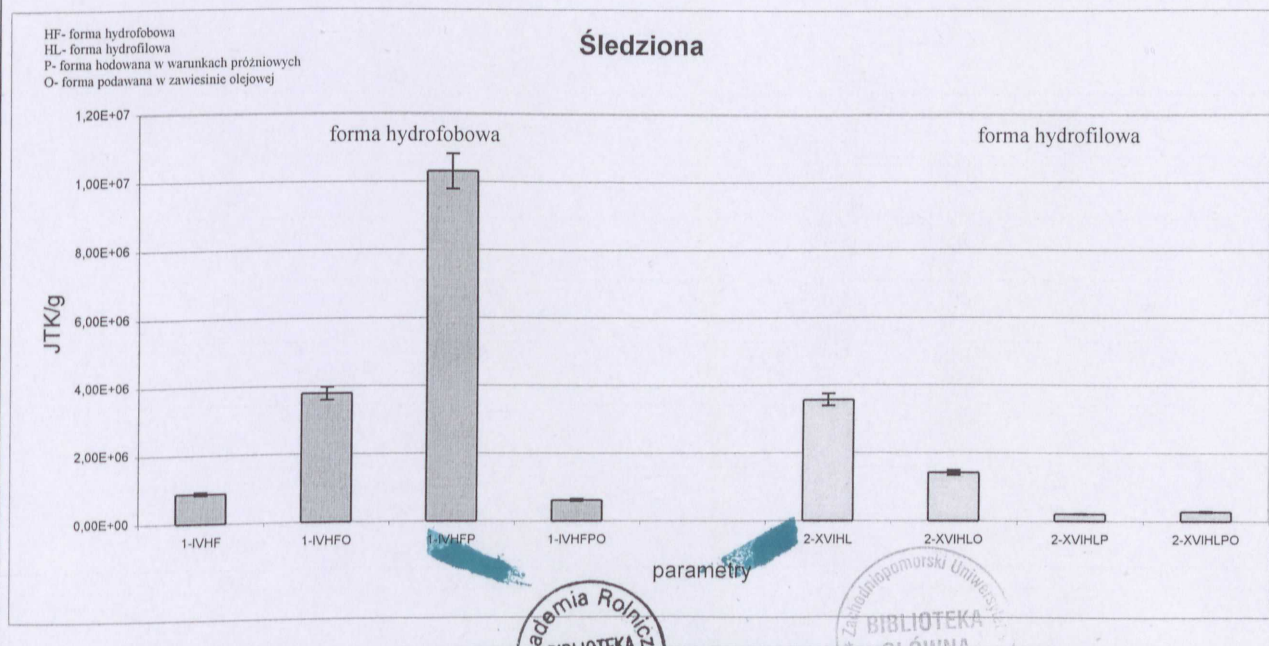
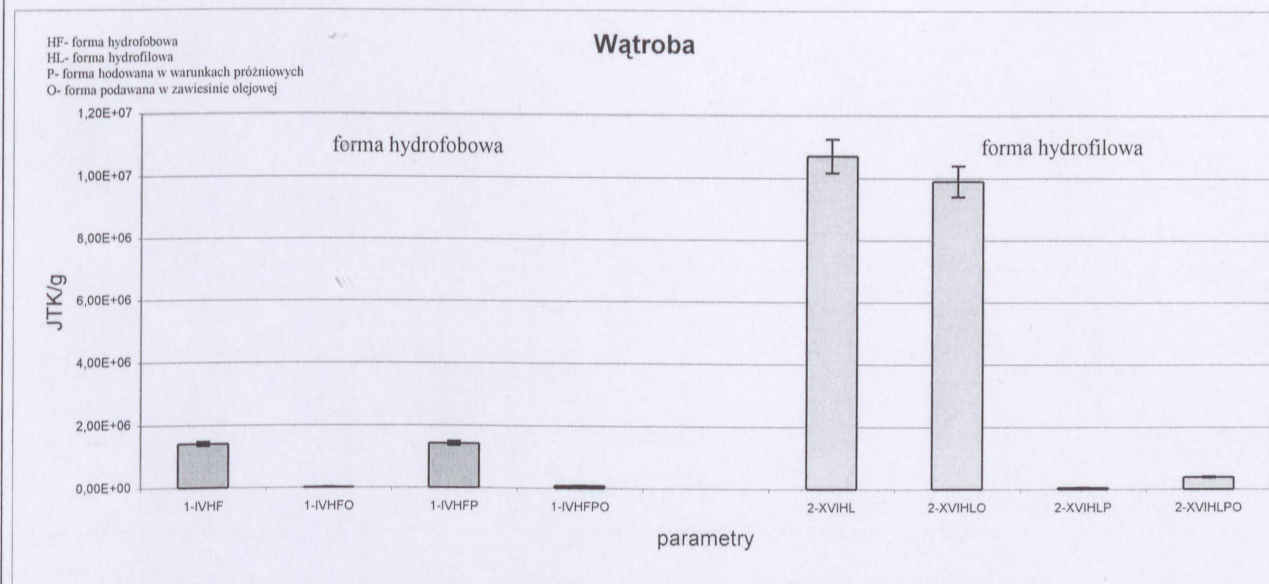
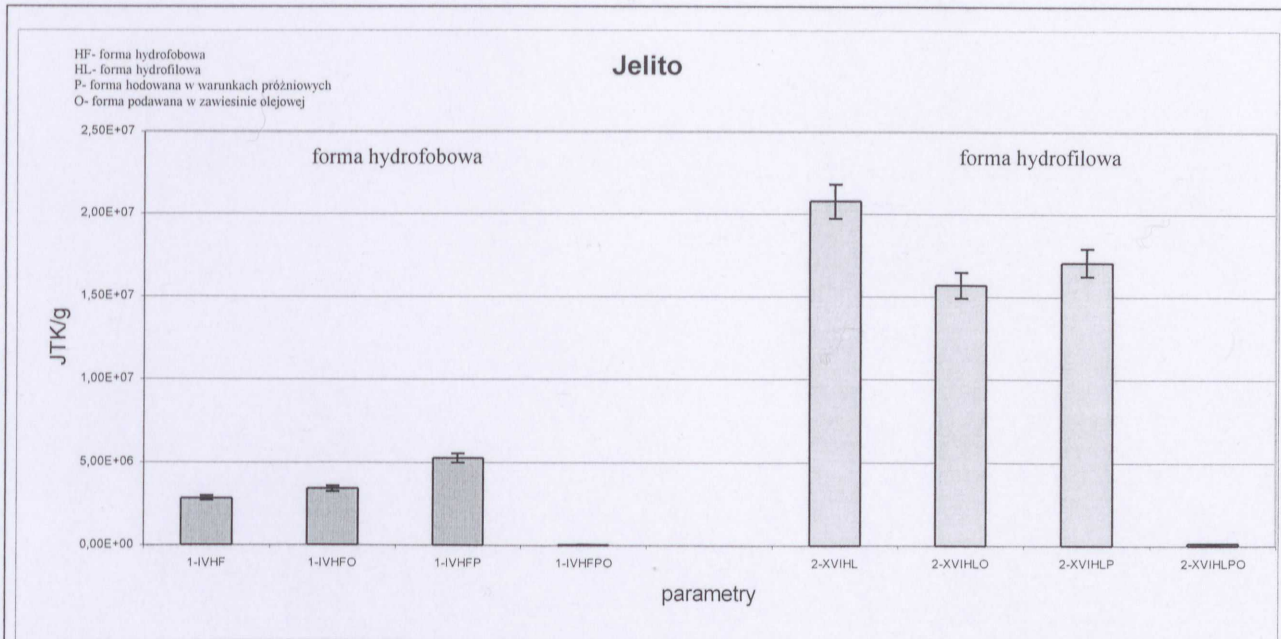
Ryc. 32. Adhezyjność szczepu 1-IV *Listeria monocytogenes* do poszczególnych typów osłonek powleczonych filmem z mieszaniny nienasyconych kwasów tłuszczowych.



Ryc.33. Uśredniony wykres hydrofobowości i dendrogram podobieństwa szczepów *L. monocytogenes* w zależności od parametrów wzrostu.



Ryc. 34. Patogenność *Listeria monocytogenes*.



Biblioteka Główna
Zachodniopomorskiego Uniwersytetu
Technologicznego w Szczecinie

CZ 57496



001-057496-00-0