

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU

WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ

mgr inż. Ewa Wałęcka

**Badanie wpływu stresu środowiskowego
na wirulencję *Listeria monocytogenes*.**

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem:

dr hab. Jacka Bani, prof. nadzw.

w Katedrze Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta

Wydziału Medycyna Weterynaryjnej

Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Wrocław 2011

Niniejszą pracę dedykuję

**Rodzicom i rodzeństwu
oraz Maciejowi**

Dziękuję:

Mojemu promotorowi,
dr hab. Jackowi Bani za nieocenioną pomoc w trakcie całej pracy,
opiekę oraz życzliwość.

mgr inż. Maciejowi Zacharskiemu za sporządzenie rycin
do wstępu niniejszej dysertacji.

Karinie Knapik oraz mgr inż. Alicji Tomaszek za pomoc techniczną.

Dziękuję wszystkim pracownikom Katedry Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia
Konsumenta za stworzenie życzliwej atmosfery w czasie pracy.

Część wyników zamieszczonych w niniejszej dysertacji została opublikowana w czasopismach:

Wałęcka E., Molenda J., Karpiskova R., Bania J. *Int. J. Food Microbiol.* 2011, 144, 440-445. Effect of osmotic stress and culture density on invasiveness of *Listeria monocytogenes* strains.

Wałęcka E., Molenda J., Karpiskova R., Bania J. *Foodborne Pathog. Dis.* 2011, 8, 839-841. Effect of heat exposure on invasiveness of *Listeria monocytogenes* strains.

Rozdziały **1.2** i **1.7** niniejszej dysertacji zostały napisane w oparciu o pracę:

Wałęcka E., Molenda J., Bania J. *Pol. J. Vet. Sci.* 2009, 12, 575-579. The impact of environmental stress on *Listeria monocytogenes* virulence.

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP.....	9
1.1. Wprowadzenie	9
1.2. Epidemiologia.....	9
1.3. Patogeneza	11
1.4. Stres i wirulencja	13
1.5. Stres osmotyczny	15
1.6. Stres cieplny	18
1.7. Sigma B, rola w odpowiedzi na stres oraz w wirulencji <i>L. monocytogenes</i>	23
2. CEL PRACY	27
3. MATERIAŁY I METODY	28
3.1. Materiały.....	28
3.1.1. Odczynniki.....	28
3.1.2. Podłoża mikrobiologiczne	28
3.1.4. Oprogramowanie.....	29
3.1.5. Szczepy bakterii	29
3.1.6. Linia komórek eukariotycznych.....	30
3.2. Metody.....	30
3.2.1. Hodowla bakterii i wyznaczenie krzywej wzrostu	30
3.2.2. Hodowla bakterii w celu określenia wpływu stresu osmotycznego na inwazyjność szczepów <i>L. monocytogenes</i>	30
3.2.3. Hodowla bakterii w celu określenia wpływu stresu cieplnego na inwazyjność szczepów <i>L. monocytogenes</i>	31
3.2.4. Hodowla szczepów <i>L. monocytogenes</i> w zbuforowanym BHI.....	31
3.2.5. Test tworzenia lysinek	31
3.2.6. Izolacja genomowego DNA.....	32
3.2.7. Izolacja RNA	32

3.2.8. Określenie genotypu <i>actA</i>	33
3.2.9. Określenie serotypu za pomocą multiplex PCR	33
3.2.10. Odwrotna transkrypcja i PCR w czasie rzeczywistym	34
3.2.11. Analiza statystyczna.....	35
4. WYNIKI.....	36
4.1. Określenie genotypu <i>actA</i> oraz przynależności do serogrup 10 szczepów <i>L. monocytogenes</i>	36
4.2. Określenie wpływu gęstości optycznej hodowli na inwazyjność 10 szczepów <i>L. monocytogenes</i>	36
4.3. Określenie wpływu fazy wzrostu na inwazyjność 10 szczepów <i>L. monocytogenes</i> hodowanych w zbuforowanym BHI.....	38
4.4. Określenie wpływu fazy wzrostu 10 szczepów <i>L. monocytogenes</i> na odpowiedź na stres osmotyczny.....	40
4.5. Określenie wpływu stężenia NaCl na przeżywalność i inwazyjność 10 szczepów <i>L. monocytogenes</i>	41
4.6. Określenie wpływu czasu działania 0.3 M NaCl na inwazyjność 4 szczepów <i>L. monocytogenes</i>	43
4.7. Określenie względnej ekspresji <i>inlA</i> , <i>inlB</i> oraz <i>opuCA</i> w 10 szczepach <i>L. monocytogenes</i> poddanych działaniu 0.3 M NaCl przez 10 minut	43
4.8. Określenie redukcji liczby bakterii w 10 szczepach <i>L. monocytogenes</i> ogrzewanych w temperaturze 54°C.....	44
4.9. Określenie wpływu ogrzewania w temperaturze 54°C na inwazyjność 10 szczepów <i>L. monocytogenes</i>	46
4.10. Określenie względnej ekspresji <i>inlA</i> oraz <i>inlB</i> w szczepach 10 <i>L. monocytogenes</i> ogrzewanych w temperaturze 54°C przez 20 i 60 minut	47
5. DYSKUSJA	49
WNIOSKI.....	55
PIŚMIENNICTWO	56

STRESZCZENIE

L. monocytogenes jest szeroko rozpowszechniona w środowisku. Przenoszona przez żywność może wywoływać u ludzi zachorowania. Bakteria ta zdolna jest do inwazji komórek nefagocytujących oraz pokonywania wielu naturalnych barier w organizmie człowieka. W zależności od osobniczej wrażliwości może wywoływać infekcje o łagodnym przebiegu, jak zapalenie żołądka i jelit lub być przyczyną poważnych infekcji, jak zapalenie opon mózgowych, sepsa i poronienia. Zanim patogen wywoła zachorowanie musi przeciwstawić się szeregu niekorzystnych czynników, zarówno w trakcie wytwarzania żywności jak i w trakcie kolonizacji organizmu człowieka. W niekorzystnych warunkach środowiskowych *L. monocytogenes* zmienia swój metabolizm poprzez ekspresję specyficznego zestawu genów, inicjując odpowiedź na stres. Odpowiedź ta może nie tylko wpływać na odporność bakterii na kolejne czynniki stresowe, ale także zmieniać jej wirulencję. *L. monocytogenes* stanowi obecnie model w badaniach efektu stresu na przeżywalność, a przede wszystkim wirulencję patogenów wewnątrzkomórkowych. W niniejszej pracy analizowano wpływ stresu osmotycznego, wstrząsu cieplnego oraz gęstości optycznej hodowli na inwazyjność 10 szczepów *L. monocytogenes*. Wykazano, iż stres związany z zagęszczeniem populacji bakteryjnej powoduje spadek inwazyjności szczepów *L. monocytogenes*. Wykazano, że inwazyjność *L. monocytogenes* wzrasta w odpowiedzi na kolejny czynnik stresowy, którym w badanym modelu były stres osmotyczny oraz wstrząs cieplny. Wzrost stężenia NaCl oraz wydłużenie czasu jego działania nie powodują istotnych zmian inwazyjności patogenu. Krótki czas działania chlorku sodu oraz jego niskie stężenie są więc wystarczające do wywołania maksymalnych zmian inwazyjności *L. monocytogenes*. Czas odgrywa jednak decydującą rolę w przypadku stresu cieplnego. Krótki czas ogrzewania skutkuje redukcją liczby bakterii, wywołując obniżenie inwazyjności *L. monocytogenes*. Wydłużenie czasu ogrzewania pozwala osiągnąć wyższą redukcję liczby bakterii, wywołując jednak wzrost ich inwazyjności. Inwazyjność bakterii najsilniej zmienia się w odpowiedzi na wstrząs cieplny oraz stres związany z przejściem w fazę stacjonarną wzrostu. Odpowiedź na stres środowiskowy jest zróżnicowana w populacji *L. monocytogenes* i trudno będzie stworzyć jednolity sposób przewidywania zachowania jej szczepów w warunkach stresu. Badania nad efektem czynników stresowych na patogenność *L. monocytogenes* mogą być pomocne w

projektowaniu nowoczesnych metod utrwalania żywności, wykazujących wysoką skuteczność redukcji liczby patogennych mikroorganizmów nie wzbudzając jednocześnie odpowiedzi na stres.

1. WSTĘP

1.1. Wprowadzenie

Listeria monocytogenes jest względnie beztlenową, nie wytwarzającą przetrwalników, Gram-dodatnią pałeczką (Farber i Peterkin, 1991). Po raz pierwszy opisana została przez E. G. D. Murraya w 1926 roku jako przyczyna padnięć gryzoni w Anglii i nazwana przez swojego odkrywcę *Bacterium monocytogenes* (Swaminathan i Gerner-Smidt, 2007, Starvu *i wsp.*, 2011). Rok później Pirie wyizolował ten sam mikroorganizm z wątroby myszokoczka i zaproponował nazwę *Listerella hepatolytica*, dla upamiętnienia pioniera antyseptyki, brytyjskiego chirurga, lorda Josepha Listera. Ostatecznie drobnoustrój ten został nazwany *Listeria monocytogenes* (Farber i Peterkin, 1991).

L. monocytogenes ma stosunkowo niewielkie wymagania pokarmowe, jest zdolna do wzrostu w szerokim zakresie temperatur (3°C - 45°C) i pH (5 - 9.6) oraz w środowisku zawierającym do 10% soli (Bajard *i wsp.*, 1996). Bakteria ta jest szeroko rozpowszechniona w środowisku, w tym w glebie, wodzie, ściekach oraz odchodach ludzkich i zwierzęcych. Jej naturalnym środowiskiem jest gnijąca roślinność, gdzie żyje jako saprofit (Vázquez-Boland *i wsp.*, 2001). W obrębie gatunku wyróżniono 13 serotypów, które mogą być zaklasyfikowane do trzech genotypów *actA* (Ragon *i wsp.*, 2008). Genotyp I obejmuje serotypy 1/2b, 3b, 4b, 4d oraz 4e, natomiast serotypy 1/2a, 1/2c, 3a oraz 3c należą do genotypu II. Pozostałe serotypy, tj. 4a i 4c należą do genotypu III i bardzo rzadko są izolowane od ludzi (Zhang *i wsp.*, 2003). Za ponad 90% przypadków listeriozy u ludzi odpowiedzialne są serotypy 1/2a, 1/2b oraz 4b, spośród których 1/2a i 1/2b są najczęściej izolowane z żywności, a 4b z przypadków klinicznych (Swaminathan i Gerner-Smidt, 2007).

1.2. Epidemiologia

Przez wiele lat *L. monocytogenes*, zidentyfikowana pierwotnie jako przyczyna monocytozy u gryzoni, a następnie jako przyczyna zapalenia opon mózgowych i mózgu oraz ronień u przeżuwaczy, uchodziła za patogen zwierząt, który może być przenoszony na ludzi. Listeriozę u ludzi, głównie pacjentów z upośledzonym układem immunologicznym, diagnozowano sporadycznie. Przypadki zbiorowych listerioz zanotowane w Ameryce Północnej i Europie pod koniec lat 70-tych XX spowodowały, że bakteria została oficjalnie

uznana za patogen ludzi (Czuprynski i Haak-Frendscho, 1997). Dekadę później zaliczono ją do grupy patogenów przenoszonych przez żywność (Low i Donachie 1997; Stavru *i wsp.*, 2011). Większość przypadków listeriozy ludzi spowodowanych jest konsumpcją zanieczyszczonej przez patogen żywności, najczęściej produktów mlecznych, serów miękkich, wędzonych ryb, owoców morza oraz żywności gotowej do spożycia (Vázquez-Boland *i wsp.*, 2001). Dawka infekcyjna *L. monocytogenes* nie została określona, gdyż uzależniona jest od wrażliwości osobniczej i właściwości patogennych szczepu. Szacuje się jednak, iż nawet dawka 100 j.t.k/ml może wywołać zachorowanie (Fretz *i wsp.*, 2010). Kliniczne symptomy listeriozy są zróżnicowane. U ludzi z prawidłowo funkcjonującym układem odporności patogen zwykle wywołuje infekcje o łagodnym przebiegu, takie jak zapalenie żołądka i jelit. U osób z obniżoną odpornością, jak osoby starsze, kobiety w ciąży, noworodki, nosiciele HIV i osoby z chorobą nowotworową zakażenie *L. monocytogenes* może być przyczyną poważnych infekcji jak zapalenie opon mózgowych i mózgu, posocznicy oraz poronień (McGann *i wsp.*, 2007). U niemal 47% pacjentów zakażonych *L. monocytogenes* dochodzi do infekcji centralnego układu nerwowego. Patogen ten jest jedną z najczęstszych przyczyn zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych w Ameryce Północnej i Europie Zachodniej (Drevets i Bronze, 2008). Z tego względu Amerykański Departament Rolnictwa oraz Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA) ustaliły tzw. zerową tolerancję dla *L. monocytogenes* w żywności gotowej do spożycia (Voetsch *i wsp.*, 2007). Zgodnie z normami obowiązującymi w krajach Unii Europejskiej (Rozporządzenie nr 1441/2007) dopuszcza się obecność 100 j.t.k. *L. monocytogenes* w 1g żywności gotowej do spożycia, za wyjątkiem produktów przeznaczonych dla niemowląt oraz produktów specjalnego przeznaczenia medycznego.

Mimo zwiększonego nadzoru nad produkcją żywności *L. monocytogenes* wciąż pozostaje poważnym zagrożeniem. Częstość występowania listeriozy kształtuje się na poziomie 0.1 do 11.3 przypadków na milion ludzi w różnych krajach (Swaminathan i Gerner-Smidt, 2007; Drevets i Bronze, 2008). W Stanach Zjednoczonych zakażenia ludzi *L. monocytogenes* stanowią trzecią pod względem liczby przypadków przyczynę zatruc pokarmowych o skutku śmiertelnym (Scallan *i wsp.*, 2011). W Kanadzie w 2008 roku opisano zbiorowe zachorowanie na listeriozę. Dotknęło ono 57 pacjentów, z których 22 zmarło. Również w Austrii i w Niemczech w latach 2009 i 2010 miało miejsce zachorowanie związane ze spożyciem skażonego twarogu, w wyniku którego hospitalizowano 33 pacjentów z objawami listeriozy. W wyniku tego zachorowania 8 pacjentów zmarło (Fretz *i wsp.*, 2010). W Polsce,

zgodnie z danymi Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego, liczba zachorowań na listeriozę w 2010 roku wynosiła 55 i była dwukrotnie wyższa w porównaniu z rokiem 2009.

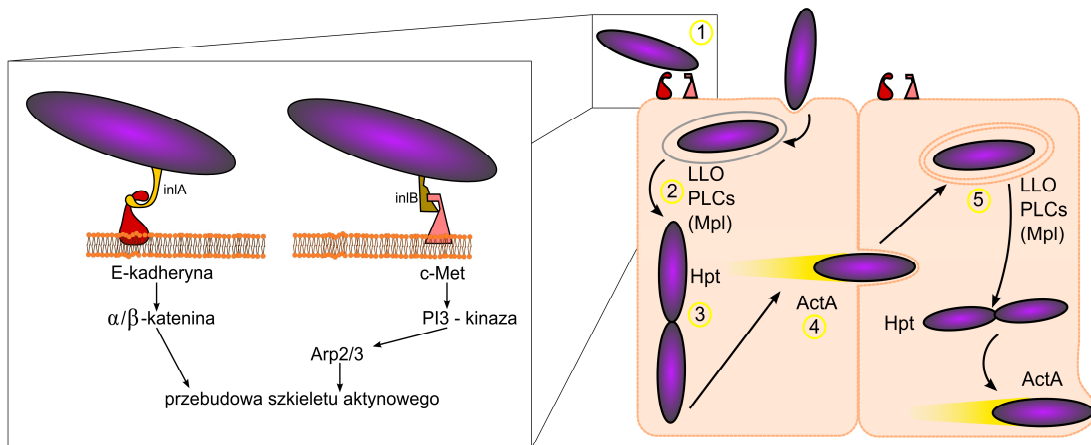
1.3. Patogeneza

L. monocytogenes jest patogenem wewnątrzkomórkowym zdolnym do pokonywania trzech istotnych barier w organizmie człowieka: bariery jelitowej, bariery łożyskowej oraz bariery krew-mózg (Vázquez-Boland *i wsp.*, 2001). Bateria ta potrafi również przeżywać wewnątrz makrofagów (Cossart i Toledo-Arana, 2008). W trakcie inwazji przewodu pokarmowego *L. monocytogenes*, wykorzystując kłębki Peyera, atakuje nabłonek jelita, a następnie rozprzestrzenia się w organizmie naczyniami limfatycznymi oraz krwionośnymi. Pierwszymi narządami zajęte przez patogen są zwykle wątroba i śledziona. Zakażenia pałeczkami *L. monocytogenes* prowadzą często do sepsy, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu oraz poronień (Vázquez-Boland *i wsp.*, 2001).

L. monocytogenes potrafi wnikać do różnego typu komórek nefagocytycznych, a także rozprzestrzeniać się w tkankach przenikając z komórki do komórki. Infekcję zapoczątkowuje adhezja do powierzchni komórek eukariotycznych (Vázquez-Boland *i wsp.*, 2001). Poprzez interakcję powierzchniowych ligandów komórki bakteryjnej z receptorami komórkowymi, patogen wnika na zasadzie fagocytozy do komórki gospodarza (Lecuit *i wsp.*, 1997). Do najważniejszych powierzchniowych ligandów bakteryjnych należą internaliny InlA oraz InlB. Internaliny posiadają N-końcową domenę, w obrębie której znajdują się bogate w leucynę powtórzenia, odpowiedzialne za interakcję z receptorami na powierzchni komórek gospodarza. InlA, oddziałując z E-kadheryną, warunkuje wnikanie do komórek epitelium, endotelium, a także hepatocytów (Bierne *i wsp.*, 2007). C-końcowa domena E-kadheryny wiąże β -kateninę, która następnie oddziałuje z α -kateniną, prowadząc do rearanżacji cytoszkieletu, umożliwiając patogenowi wniknięcie do komórek gospodarza (Lecuit *i wsp.*, 2000). InlB odpowiedzialna jest za inwazję komórek epitelium, endotelium, hepatocytów oraz fibroblastów. Białko to ma trzy receptory, tj. gC1qR/p32, Met/HGFR (receptor czynnika wzrostu hepatocytów) oraz GAGs (glikozoaminoglikany), z których najistotniejszym jest białko Met. InlB wiążąc białko Met aktywuje kinazę tyrozynową, a następnie PI-3 kinazę, co prowadzi do aktywacji kompleksu Arp2/3 (białka 2 i 3 związane z aktyną), a następnie do rekrutacji aktyny i fagocytozy (Bierne *i wsp.*, 2007). Po wniknięciu do komórki eukariotycznej bakteria jest zamykana w pęcherzyku fagocytarnym, z którego uwalnia się po

około 30 minutach (Tilney *i wsp.*, 1989). Najistotniejszym czynnikiem wirulencji, umożliwiającym patogenowi lizę fagosomu, jest listeriolizyna O (LLO). LLO jest zależną od cholesterolu hemolizyną. Czynnikiem ten aktywny jest w wąskim zakresie pH, z optimum w pH 5.5 (Vázquez-Boland *i wsp.*, 2001). N-końcowy region LLO zawiera sekwencję typu PEST, bogatą w prolinę, kwas glutaminowy, serynę i treoninę. Sekwencja ta w komórkach eukariotycznych odpowiedzialna jest za kierowanie białek do degradacji. Zgodnie z wcześniejszymi koncepcjami uważano, że sekwencja typu PEST obecna w LLO może kierować to białko do degradacji w cytozolu, ograniczając tym samym hemolityczną aktywność listeriolizyny (Decatur i Portnoy, 2000). Ostatnie badania dowodzą, że obecna w LLO sekwencja PEST nie wpływa na ubikwitynację i wewnątrzkomórkowy okres półtrwania tego białka (Schnupf *i wsp.*, 2006). Singh i współpracownicy (2008) wykazali, że za aktywację listeriolizyny odpowiedzialna jest lizosomalna oksydoreduktaza tiolowa indukowana przez γ -interferon (GILT). Białko GILT obecne w fagosomach komórek eukariotycznych redukuje resztę cysteiny w pozycji 485 białka LLO, co ujawnia zdolności hemolityczne listeriolizyny (Singh *i wsp.*, 2008). W procesie ucieczki *L. monocytogenes* z wakuoli, listeriolizynę wspomagają fosfolipazy. Fosfolipaza PI-PLC wykazuje wysoką specyficzność dla fosfatydyloinozytolu i jest niezbędna do lizy wewnętrznej strony błony fagosomu, podczas gdy fosfolipaza PC-PLC (lecytynaza) jest specyficzna dla fosfatydylocholiny i jest wymagana do lizy błony zewnętrznej fagosomu (Camilli *i wsp.*, 1993; Smith *i wsp.*, 1995). Aktywacja lecytynazy uwarunkowana jest aktywnością specyficznej metaloproteiny wytwarzanej przez *L. monocytogenes* (Poyart *i wsp.*, 1996). Po przeniknięciu do cytozolu *L. monocytogenes* dostosowuje swój metabolizm do warunków otoczenia. Adaptacja do wzrostu w cytozolu związana jest m.in. z ekspresją transportera heksozy (Hpt) (Starvu *i wsp.*, 2011). Przemieszczanie się w cytozolu zapewnia bakterii ekspresja białka ActA. Jest to białko ekspresjonowane na powierzchni bakterii, zawierające 3 domeny, tj. bogatą w naładowane dodatnio reszty domenę N-końcową, bogaty w prolinę region centralny oraz domenę C-końcową. N-końcowy region odpowiedzialny jest za polimeryzację F-aktyny komórek eukariotycznych (Lasa *i wsp.*, 1995). ActA przypomina, zdolne do inicjacji polimeryzacji aktyny, eukariotyczne białko syndromu Wiskott-Aldrich. Centralny region ActA wiąże białko VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein), które oddziałując z profiliną, białkiem wiążącym G-aktynę, wspomaga elongację filamentu. Uczestnicząca w procesie α -aktynina sieciuje filament aktyny, stabilizując aktynowy ogon, a kofilina, czynnik depolimeryzujący aktynę, usuwa stare filamente, zapobiegając ich

wydłużeniu. Ze względu na polarny charakter ekspresji ActA w komórkach *L. monocytogenes* aktywny ogon tworzy się tylko z jednej strony pałeczki. Gromadzenie się aktyny generuje ruch bakterii w cytozolu, w wyniku którego patogen może przemieszczać się w kierunku komórek sąsiadujących (Cameron *i wsp.*, 2000; Starvu *i wsp.*, 2011) (**Ryc. 1**).



Ryc. 1. Wewnątrzkomórkowy cykl życiowy *L. monocytogenes*. (1) *L. monocytogenes* przylega do komórki gospodarza co zapoczątkowuje proces wnikania. Za internalizację odpowiedzialne są internaliny: InlA i InlB, które oddziałują ze swoimi ligandami, odpowiednio E-kadheryną i białkiem c-Met. (2) Bakterie zostają zamknięte w wakuoli, z której ucieczka odbywa się dzięki ekspresji listeriolizyny O (LLO) oraz fosfolipaz PlcA i PlcB (aktywowana przez metaloproteinazę). (3) Po przeniknięciu do cytozolu bakteria dostosowuje swój metabolizm do otoczenia, poprzez ekspresję specyficznych białek, w tym transportera heksozy (Hpt). (4) Patogen przemieszcza się w kierunku sąsiednich komórek dzięki ekspresji białka ActA, zostaje zamknięty w fagosomie otoczonym podwójną błoną i ponownie wydostaje się do cytozolu (5).

1.4. Stres i wirulencja

Przebywając w środowisku zewnętrznym oraz w kolonizowanych organizmach *L. monocytogenes* narażona jest na działanie niekorzystnych dla swojego wzrostu warunków. Podczas produkcji żywności, jej utrwalania oraz przechowywania, patogen narażony jest na działanie wielu czynników stresowych, obejmujących czynniki fizyczne, takie jak ogrzewanie, promieniowanie, wysokie ciśnienie, pulsujące pole elektryczne, fale ultradźwiękowe, a także czynniki chemiczne, takie jak sole, kwasy i utleniacze (Yousef i Polly, 2002). Kolejnym wyzwaniem dla bakterii jest działanie środowiska przewodu pokarmowego człowieka. Zasadniczym czynnikiem stresowym napotkanym przez *L.*

monocytogenes w przewodzie pokarmowym jest niskie pH żołądka. Bakterie które przetrwają warunki panujące w żołądku mogą przedostawać się do dwunastnicy, gdzie spotykają się z obecnością lotnych kwasów tłuszczowych, niskim stężeniem tlenu, zwiększonym ciśnieniem osmotycznym oraz obecnością flory jelitowej. W świetle jelita bakteria musi także przetrwać stres związany z obecnością soli żółciowych (Gahan *i wsp.*, 1999; Begley *i wsp.*, 2002; Lungu *i wsp.*, 2009). Aby przetrwać w szkodliwych warunkach bakteria musi zmienić swój metabolizm. Jest to możliwe dzięki ekspresji specyficznego zestawu genów, co prowadzi do wytworzenia białek umożliwiających bakterii eliminację czynników stresowych oraz przywrócenie homeostazy (Yousef i Polly, 2002). Biorąc pod uwagę fakt, iż *L. monocytogenes* wykazuje znaczną oporność na czynniki środowiskowe, jak niska temperatura, niskie pH, czy wysokie stężenie soli, niektóre procedury stosowane w utrwalaniu żywności mogą okazać się nieefektywne w redukcji liczby bakterii.

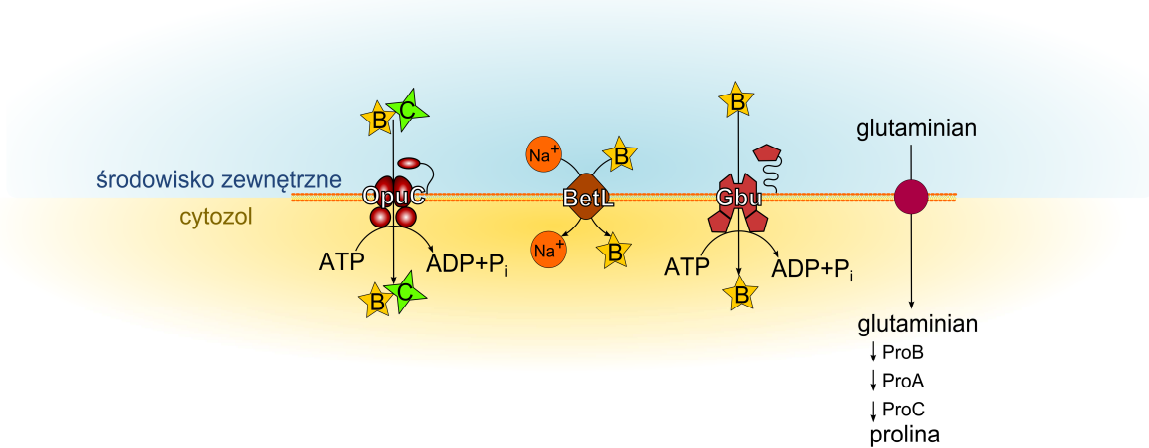
W niesprzyjających warunkach bakterie inicjują odpowiedź na stres. Odpowiedź ta może zwiększać odporność patogenu na kolejne dawki czynników stresowych, a także przyczyniać się do wzrostu jego wirulencji. Uważa się, że posiadanie skuteczniejszych mechanizmów odpowiedzi na stres może wiązać się ze zwiększoną wirulencją niektórych szczepów (Roche *i wsp.*, 2005). Wirulencja poszczególnych szczepów *L. monocytogenes* wydaje się być heterogenna. Szacuje się, że nawet 21% populacji *L. monocytogenes* cechuje się niską wirulencją lub jej brakiem. Wykazano, że szczepy należące do I genotypu *actA* efektywniej wnikają i rozprzestrzeniają się w komórkach nabłonkowych, a także mają znacznie krótszy czas wewnątrzkomórkowego podziału niż szczepy zaliczone do genotypu II (Wiedmann *i wsp.*, 1997; Zhou *i wsp.*, 2005). Różnice w wirulencji szczepów *L. monocytogenes* mogą być częściowo spowodowane mutacjami genów wirulencji. Wpływ na inwazyjność może mieć obecność przedwczesnego kodonu stop w genie internaliny A, *inlA*, co prowadzi do powstania skróconej formy białka (Nightingale *i wsp.*, 2005; Nightingale *i wsp.*, 2008). Ważną rolę w procesie inwazji komórek eukariotycznych przez *L. monocytogenes* pełni także białko Ami (amidaza), p60 (białko związane z inwazją), ActA oraz flagelina (FlaA). Mutacje w genach kodujących te białka mogą negatywnie oddziaływać na zdolność bakterii do wnikania do nabłonków (Chatterjee *i wsp.*, 2005). Delecja genu *hly* kodującego listeriolizynę O bądź jego nadekspresja mogą skutkować zmniejszeniem wirulencji. Zwiększony poziom LLO może być wywołany mutacjami w sekwencji typu PEST, bądź mutacjami zmieniającymi optimum pH listeriolizyny, które zwiększając jej aktywność w cytoplazmie przyczyniają się do uszkodzenia błony komórkowej gospodarza i eliminacji bakterii przez układ

odpornościowy gospodarza (Roberts *i wsp.*, 2005). Osłabienie wirulencji może być także spowodowane mutacjami wprowadzającymi wczesny kodon stop w genie *prfA*, kodującym białko PrfA, tj. pozytywny regulator genów wirulencji (Roche *i wsp.*, 2005).

1.5. Stres osmotyczny

Siła osmotyczna środowiska jest jednym z istotnych czynników oddziałujących na wzrost bakterii (Csonka, 1989). Nagła zmiana jej wartości, określana mianem wstrząsu osmotycznego, wywołuje gwałtowny przepływ wody przez membranę cytoplazmatyczną w kierunku zdefiniowanym przez osmolarność środowiska zewnętrznego (Wood, 1999). Spadek ciśnienia osmotycznego powoduje przenikanie wody do wnętrza komórki, zwiększając turgor, co może prowadzić do jej pęknięcia. Wzrost ciśnienia osmotycznego wiąże się z przenikaniem wody do środowiska, co prowadzi do odwodnienia komórki, spadku turgoru i zmniejszenia aktywności wody wewnątrz komórki (Ziegler *i wsp.*, 2010). *L. monocytogenes* potrafi przetrwać w środowisku o stężeniu 10% soli (McClure *i wsp.*, 1989; Chowduhry *i wsp.*, 1996). Aby zapobiec niekorzystnemu działaniu soli patogen aktywnie reguluje przepływ specyficznych substancji poprzez błonę (**Ryc. 2**). Ponieważ substancje te pojawiają się w cytoplazmie wyłącznie w odpowiedzi na stres i nie wpływają na funkcjonowanie komórki w warunkach normalnych, określane są mianem substancji kompatybilnych (Wood, 2007). Substancje kompatybilne są niezbędne do utrzymania turgoru komórki. Zdolność bakterii do kumulacji tych substancji wiąże się z możliwością ich przetrwania w warunkach zwiększonej siły osmotycznej (Angelidis *i wsp.*, 2003b). Substancje kompatybilne można podzielić na dwie grupy: elektrolity, takie jak jony K^+ i glutaminian oraz substancje organiczne, takie jak glicynobetaina, karnityna oraz prolina (Csonka, 1989). Wydaje się, że odpowiedź na zwiększoną osmolarność przebiega u *L. monocytogenes* dwuetapowo. W pierwszej fazie gromadzone są jony potasu i glutaminian, natomiast substancje organiczne działają w fazie drugiej (Sleator *i wsp.*, 2003a). Jony K^+ pełnią kluczową rolę w utrzymaniu turgoru komórki, jednak wydają się być niewystarczająco skuteczne w warunkach zwiększonej siły osmotycznej (Csonka, 1989). Stężenie substancji kompatybilnych wewnątrz komórek bakterii zależy od natężenia reakcji patogenu na stres osmotyczny. Bakterie mogą zmieniać stężenie substancji kompatybilnych w cytoplazmie poprzez ich syntezę *de novo* bądź pobierać je ze środowiska zewnętrznego. Wydaje się, iż *L. monocytogenes* nie potrafi syntetyzować tych substancji i musi je transportować z otoczenia (Angelidis *i wsp.*, 2003a). Przeżywalność *L.*

monocytogenes w środowisku o wysokiej sile osmotycznej uwarunkowana jest akumulacją trzech substancji kompatybilnych: glicynybetainy, karnityny oraz proliny (Beumer *i wsp.*, 1994).



Ryc. 2. Systemy transportujące substancje kompatybilne u *L. monocytogenes*: B- betaina, C-karnityna, P-prolina.

Glicynobetaina jest najpowszechniejszą substancją kompatybilną, występującą w wysokim stężeniu w burakach cukrowych oraz innych roślinach (Beumer *i wsp.*, 1994). Zapobiega ona agregacji białek, utrzymując ich rozpuszczalność. Zmienia też właściwości fizyczne błony, pełniąc funkcję osmo oraz krioprotektanta (Ko *i wsp.*, 1994). Znane są dwa transportery glicynybetainy. Transporter I (BetL), kodowany przez gen *betL*, wykorzystuje gradient hiperosmotyczny wytworzony przez NaCl (Gerhardt *i wsp.*, 1996). Sprzężenie transportu betainy z przenikaniem kationów sodu indukuje gradient elektryczny, napędzający transport betainy. Jony Na^+ wymieniane są na proton i usuwane z komórki (Smith *i wsp.*, 1998). Transporter BetL wykazuje wysoką specyficzność do glicynybetainy i nie uczestniczy w transporcie innych osmolitów, jak cholina czy karnityna (Sleator *i wsp.*, 1999). Transporter II (Gbu) należy do rodziny transporterów posiadających kasetę wiążącą ATP (transportery ABC) i jest niezależny od kationów sodu (Ko i Smith, 1999). Gbu złożony jest z trzech podjednostek: ATPazy, kanału transmembranowego złożonego z sześciu helis oraz białka wiążącego substrat, kodowanych odpowiednio przez geny *gbuA*, *gbuB* i *gbuC* (Ko i Smith, 1999). Gbu aktywowany jest gradientem KCl lub sacharozy (Gerhardt *i wsp.*, 2000). Aktywność Gbu warunkuje przeżywalność *L. monocytogenes* w warunkach wysokiego zasolenia. W przeciwieństwie do transportera I, Gbu ma udział w kriotolerancji *L. monocytogenes*, a także w regulacji poziomu osmoprotektantów (Gerhardt *i wsp.*, 2000;

Mendum *i wsp.*, 2002a; Mendum *i wsp.*, 2002b). Gbu może także transportować karnitynę (Angelidis *i wsp.*, 2003b). Karnityna syntetyzowana jest przez ssaki i mikroorganizmy eukariotyczne z lizyny, gdzie służy jako przekaźnik kwasów tłuszczowych. Głównym transporterem karnityny u *L. monocytogenes* jest OpuC, należący do rodziny transporterów ABC (Verheul *i wsp.*, 1995). OpuC złożony jest z czterech podjednostek: białka wiążącego ATP, zewnątrzkomórkowego białka wiążącego substrat oraz dwóch białek membranowych. Podjednostki te kodowane są odpowiednio przez geny *opuCA*, *opuCC*, *opuCB* i *opuCD* (Fraser *i wsp.*, 2000). OpuC zaangażowany jest w odpowiedź na stres osmotyczny i stres wywołany niskimi temperaturami (Angelidis *i wsp.*, 2002). Wpływając na płynność błony komórkowej bierze udział także w barotolerancji *L. monocytogenes* (Smiddy *i wsp.*, 2004). OpuC wpływa na wirulencję patogenu, gdyż mutanty *L. monocytogenes* pozbawione genu *opuC* tracą zdolność kolonizacji jelita cienkiego myszy (Wemekamp-Kamphuis *i wsp.*, 2002, Sleator *i wsp.*, 2001a). Wytwarzanie betainy i karnityny jest przynajmniej częściowo regulowane na poziomie transkrypcji w sposób zależny od alternatywnego czynnika transkrypcyjnego σ^B (Becker *i wsp.*, 1998; Fraser *i wsp.*, 2003; (Cetin *i wsp.*, 2004). Transport betainy i karnityny może być także regulowany na poziomie enzymatycznym. Wykazano, iż pobieranie tych substancji przez bakterie ze środowiska hamowane jest obecnością obu osmolitów na wewnętrznej powierzchni błony. Efekt inhibicji zanika w warunkach wstrząsu osmotycznego. Jest to prawdopodobnie spowodowane zmianami w strukturze błony, wpływającymi na wiązanie betainy i karnityny (Verheul *i wsp.*, 1997). Kolejnym osmolitem zaangażowanym w odpowiedź *L. monocytogenes* na stres osmotyczny jest prolina. Mechanizm transportu tej substancji nie został dotąd poznany. Aminokwas ten może być syntetyzowany w komórce z glutaminianu z udziałem trzech enzymów (Sleator *i wsp.*, 2001c). Wykazano, że zahamowanie syntezy proliny, poprzez inaktywację locus *proAB* wpływa na wzrost i przeżywalność *L. monocytogenes* w warunkach podwyższonej osmolarności (Sleator *i wsp.*, 2001b; Patchett *i wsp.*, 1992). Regulacja stężenia proliny w komórce zachodzi przez zwrotną inhibicję pierwszego enzymu szlaku, kodowanego przez gen *proB* (Sleator *i wsp.*, 2001c).

W odpowiedź na stres osmotyczny zaangażowane są również białka wstrząsu cieplnego tj. DnaK, ATP-aza ClpC, proteaza serynowa ClpP, a także białko Ctc. W nieobecności osmoprotektantów, takich jak karnityna i glicynobetana Ctc bierze udział w osmotolerancji *L. monocytogenes* (Duché *i wsp.*, 1994). Mutant *ctc* odznacza się dwukrotnie niższą szybkością wzrostu. N-końcowa część białka Ctc wykazuje podobieństwo do białka

L25 wchodzącego w skład podjednostki 50s rybosomu. Ctc najprawdopodobniej wiąże się z podjednostką 5S rRNA. Można przypuszczać, że przy udziale Ctc, rybosomy pełnią rolę sensorów stresu osmotycznego. Innym białkiem ułatwiającym *L. monocytogenes* przetrwanie w środowisku o wysokiej sile osmotycznej jest syntetaza polifosforanów guanozyny, kodowana przez gen *relA* (Okada *i wsp.*, 2002). Białko to bierze też udział w produkcji biofilmu i wpływa na wirulencję *L. monocytogenes* (Taylor *i wsp.*, 2002).

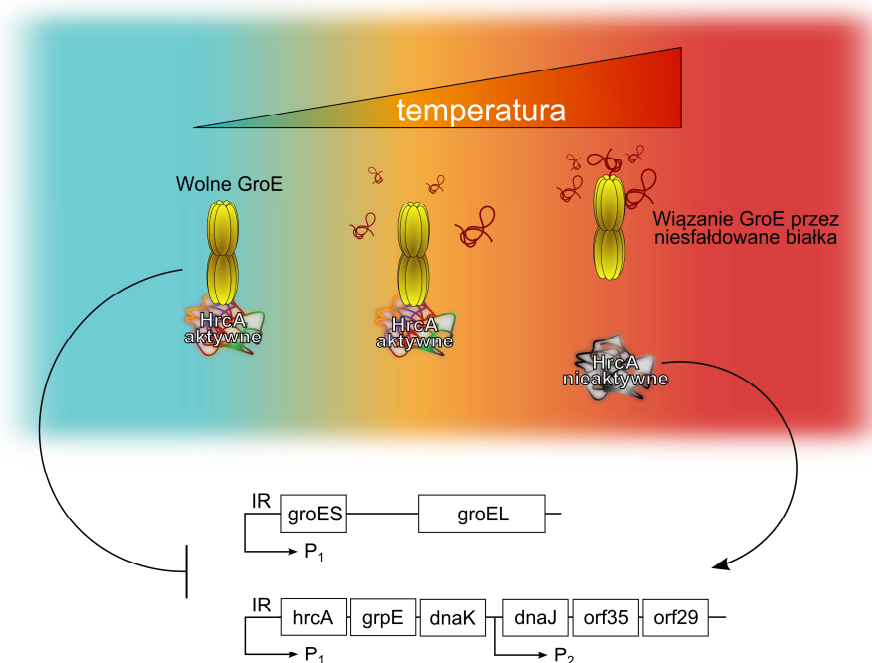
1.6. Stres cieplny

Procesy cieplne takie jak pasteryzacja czy sterylizacja są jednymi z najskuteczniejszych metod redukcji liczby bakterii w procesie utrwalania żywności. Wzrost temperatury może być generowany za pomocą różnego rodzaju energii, jak światło, fale ultradźwiękowe, czy energia mikrofalowa. Energia termiczna oddziałuje nie tylko na komórkę jako całość, ale także na struktury komórkowe oraz makrocząsteczki. Wiele struktur komórkowych oraz makrocząsteczek takich jak, rybosomy, kwasy nukleinowe, niektóre enzymy i białka w pewnych zakresach temperatur cechuje się naturalną stabilnością, która może decydować o ciepłopoorności bakterii (Earnshaw *i wsp.*, 1995). Mechanizm ciepłopoorności jest skomplikowany i nie w pełni wyjaśniony. Związany jest on z wytwarzaniem przez komórki białek wstrząsu cieplnego (Hsp lub molekularne czaperony) (Lundén *i wsp.*, 2008). Obserwacje dowodzą, iż podwyższanie temperatury powyżej optimum wzrostu bakterii prowadzi do kumulacji wadliwie sfałdowanych, najczęściej nieaktywnych białek, które najczęściej kierowane są przez komórkę na drogę proteolitycznej degradacji (Skowyrza *i wsp.*, 1990). Białka wstrząsu cieplnego obecne są w komórkach również w optymalnych temperaturach wzrostu, pełniąc istotne dla komórki funkcje. W odpowiedzi na stres cieplny bakterie zwiększają syntezę tych białek, stymulując w ten sposób naprawę białek zdenaturowanych termicznie. Wysoki poziom Hsp zapewnia jednocześnie stabilizację istniejących polipeptydów i uniknięcie niewłaściwego fałdowania i agregacji białek (Yura i Nakahigashi, 1999). *L. monocytogenes* posiada trzy klasy genów indukowanych podwyższoną temperaturą, z których geny klasy I i III są negatywnie regulowane odpowiednio za pomocą HrcA i CtsR, a geny klasy II są pozytywnie regulowane przez σ^B (Hu *i wsp.*, 2007a; Hu *i wsp.*, 2007b).

Najlepiej poznanymi molekularnymi czaperonami, zaangażowanymi w ochronę przed stresem cieplnym, są białka GroEL, GroES, DnaK oraz DnaJ (Muga i Moro, 2008). GroEL

(Hsp60) razem z GroES (Hsp10) biorą udział w regulacji podstawowych procesów komórkowych zarówno w podwyższonych jak i suboptymalnych temperaturach (Fayet *i wsp.*, 1989). Za przeżywalność w podwyższonych temperaturach odpowiadają także białka DnaK (Hsp70) oraz DnaJ (Hsp40). Wszystkie z czterech wymienionych białek opiekuńczych współpracują ze sobą w utrzymaniu odpowiedniej struktury białka w wysokich temperaturach (Langer *i wsp.*, 1992). Uważa się, że kumulacja niesfałdowanych białek, wytworzonych w warunkach podwyższonej temperatury stanowi najprawdopodobniej pierwotny sygnał dla odpowiedzi na stres termiczny. Białka DnaK i DnaJ odpowiedzialne są za stabilizację konformacji niesfałdowanych białek, natomiast aktywność GroE zapewnia ich prawidłowe fałdowanie (Craig *i wsp.*, 1993). Zwiększoną syntezę białek GroE i DnaK obserwowano także w odpowiedzi na stres osmotyczny, niskie temperatury oraz na obecność etanolu w środowisku, co wskazuje na ich rolę w odpowiedzi na innego rodzaju stresy (Kilstrup *i wsp.*, 1997, Salotra *i wsp.*, 1995). Niektóre z czaperonów odgrywają także rolę w wirulencji *L. monocytogenes*. DnaK zaangażowany jest w transkrypcję czynników wirulencji, ułatwiających kontakt z komórkami epitelium, co w efekcie wpływa na inwazyjność *L. monocytogenes* (Hanawa *i wsp.*, 2002). DnaK ma też udział w tworzeniu biofilmu i wpływa na oporność na niektóre środki dezynfekcyjne (van der Veen i Abee, 2010).

Geny kodujące molekularne czaperony zorganizowane są w dwóch operonach: heksacystronowym *dnaK* (*hrcA-grpE-dnaK-dnaJ-orf35-orf29*) (Hanawa *i wsp.*, 2000) i bicystronowym *groESL* (*groES-groEL*) (Gahan *i wsp.*, 2001). Powyżej genu *hrcA* i *groES* znajduje się, kontrolujący ekspresję czaperonów, operator CIRCE (z ang. controlling inverted repeat of chaperone expression) (Segal i Ron, 1996). Obydwa operony są negatywnie regulowane przez HrcA, który może oddziaływać z operatorem CIRCE (Zuber i Schumann, 1994). Aktywność HrcA regulowana jest obecnością białka GroE. Tylko aktywny HrcA zdolny jest do wiązania się z operatorem i hamowania transkrypcji (Mogk *i wsp.*, 1997). W optymalnych warunkach wzrostu HrcA utrzymywany jest w formie aktywnej poprzez interakcję z GroE (Schumann *i wsp.*, 2003). Wzrost temperatury prowadzi do wiązania GroE przez niesfałdowane białka, co wywołuje inaktywację HrcA. W konsekwencji, nieaktywny represor oddysocjowuje z operatora, a to zwiększa ekspresję operonów *dnaK* i *groESL* (Hecker *i wsp.*, 1996). Po około ośmiu minutach, na skutek usunięcia niesfałdowanych białek, wzrasta pula wolnego GroE. HrcA może powrócić do konformacji aktywnej i ponownie oddziaływać z operatorem CIRCE (**Ryc. 3**) (Schulz i Schumann, 1996).

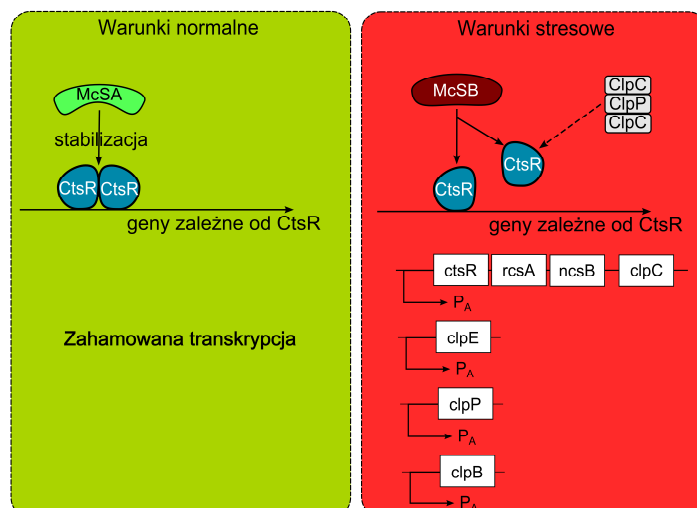


Ryc. 3. System regulacyjny HrcA-GroE. Molekularne czaperony są negatywnie regulowane przez represor HrcA, który oddziałuje z operatorem CIRCE (IR), zlokalizowanym powyżej operonów *hrcA* i *groES*. Aktywność HrcA jest regulowana obecnością białka GroE. W optymalnych temperaturach HrcA oddziałując z białkiem GroE przeprowadzany jest w formę aktywną, co prowadzi do hamowania transkrypcji operonów *hrcA* i *groES*. Wzrost temperatury GroE powoduje wiązanie GroE przez niesfałdowane białka, co wywołuje inaktywację HrcA, a tym samym ekspresję operonów.

Innym rodzajem białek wstrząsu cieplnego są białka Clp o aktywności kazeinolitycznej. Białka te występują w komórce w postaci kompleksu zależnego od ATP. Są odpowiedzialne za regulację proteolizy i prawidłowe fałdowanie się białek (Gottesman *i wsp.*, 1997). U *L. monocytogenes* zidentyfikowano cztery białka Clp, tj. ClpB, ClpC, ClpE oraz ClpP (Rouquette *i wsp.*, 1996; Nair *i wsp.*, 1999; Gaillot *i wsp.*, 2000; Chastanet *i wsp.*, 2004). ClpB, ClpC oraz ClpE należą do rodziny Clp ATPaz Hsp100. Istotną ich funkcją w komórce jest kierowanie białek do degradacji przy udziale proteiny ClpP. Proteinaza ClpP złożona jest z podjednostki proteolitycznej ClpP oraz z jednej z trzech Clp ATPaz Hsp-100 (Maurizi *i wsp.*, 1990). Jeżeli ClpP nie jest połączony z ATPazą wykazuje wyłącznie aktywność peptydazy i nie jest zdolny do degradacji peptydów złożonych z więcej niż siedmiu aminokwasów (Woo *i wsp.*, 1989). Połączenie ClpP z ATPazą, przy udziale ATP, nadaje

kompleksowi aktywność proteiny (Wang *i wsp.*, 1997). Aktywny kompleks ClpP uczestniczy w degradacji niewłaściwie sfałdowanych, toksycznych dla bakterii białek oraz w rozfałdowywaniu białek zapewniających wewnątrzkomórkową przeżywalność (Rouquette *i wsp.*, 1996; Rouquette *i wsp.*, 1998). Stwierdzono, że ClpP jest niezbędne dla wzrostu i replikacji bakterii w podwyższonej temperaturze (Porankiewicz *i wsp.*, 1999). ClpC wpływa na ekspresję takich czynników wirulencji jak InlA, InlB oraz ActA. Modyfikuje też ekspresję LLO wpływając na wirulencję *L. monocytogenes* (Nair *i wsp.*, 2000; Gaillot *i wsp.*, 2000; Gaillot *i wsp.*, 2001; Chastanet *i wsp.*, 2004). Danych na temat udziału ClpE i ClpC w wirulencji *L. monocytogenes* dostarczyły badania mutantów pozbawionych genów kodujących te białka. Na podstawie tych badań stwierdzono, że wzrost mutantów jest ograniczony w wątrobie i śledzionie (Nair *i wsp.*, 2000).

Geny kodujące białka kazeinolityczne zlokalizowane są w czterech jednostkach transkrypcyjnych, a ich ekspresja jest negatywnie regulowana przez czynnik CtsR (Nair *i wsp.*, 2000; Chastanet *i wsp.*, 2004). Represor CtsR kodowany jest przez pierwszy gen operonu *clpC* i wiąże się specyficznym do siedmionukleotydowej sekwencji operatora. CtsR występuje w formie dimeru i składa się przynajmniej z trzech funkcjonalnych domen, tj. domeny dimeryzacji, motywu helisa-skręt-helisa wiążącego DNA oraz bogatego w glicynę regionu centralnego, najprawdopodobniej odpowiedzialnego za wyczuwanie stresu (Derré *i wsp.*, 2000). Uważa się, że ostatnia domena wpływa na prawidłową konformację oraz aktywność represora (Derré *i wsp.*, 2000; Karatzas *i wsp.*, 2003). W temperaturze 37°C regulon CtsR ekspresjonowany jest na niskim poziomie. Wzrost jego ekspresji stwierdza się w warunkach stresu cieplnego. Istotą mechanizmu regulacji odpowiedzi na stres cieplny jest utrzymywanie stałego poziomu CtsR w 37°C oraz jego przejściowa inaktywacja warunkach stresu (Schumann *i wsp.*, 2003). Ważną rolę w regulacji Clp pełni białko McsA o strukturze palca cynkowego oraz kinaza tyrozynowa MscB (Kirstein *i wsp.*, 2005). W optymalnych temperaturach wzrostu McsA stabilizuje aktywność CtsR, co wywołuje represję genów zależnych od CtsR. W podwyższonych temperaturach zdolność CtsR do wiązania DNA jest modyfikowalna przez MscB, represor jest kierowany do degradacji przy udziale białek ClpCP i następuje nadekspresja genów *clp* (Krüger *i wsp.*, 2001) (**Ryc. 4**). CtsR reguluje także ekspresję genów związanych z ciepłoopornością, opornością na H₂O₂ i podwyższone ciśnienie (Joerger *i wsp.*, 2006; Karatzas i Bennik, 2002; Karatzas *i wsp.*, 2003).



Ryc.4. Regulacja genów *clp*. Geny *clp* zlokalizowane są w 4 jednostkach transkrypcyjnych i są negatywnie regulowane przez CtsR. Mechanizm regulacyjny polega najprawdopodobniej na utrzymywaniu stałego poziomu CtsR w 37°C, a następnie jego przejściowej inaktywacji w warunkach stresu. W optymalnych temperaturach wzrostu aktywność CtsR jest stabilizowana przez McsA, co prowadzi do represji genów zależnych od CtsR. W podwyższonych temperaturach zdolność CtsR do wiązania DNA jest modyfikowana przez MscB. W konsekwencji represor kierowany jest do degradacji przy udziale białek ClpCP i następuje nadekspresja genów *clp*.

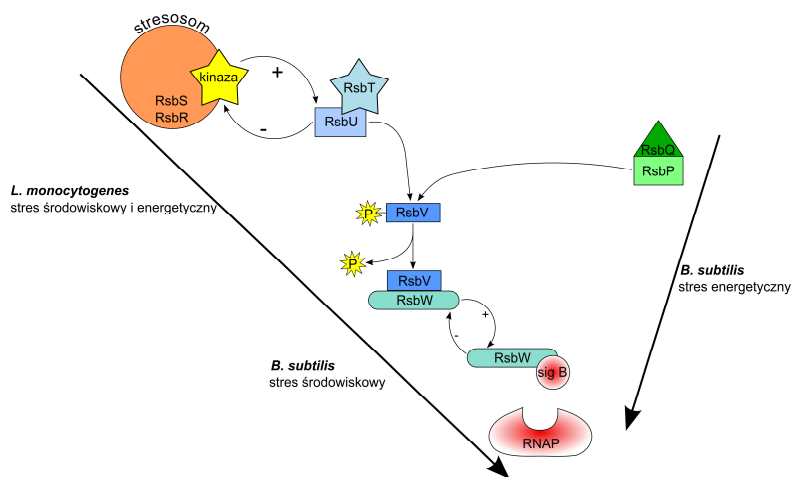
Innym białkiem indukowanym w odpowiedzi na wstrząs cieplny jest proteinaza serynowa HtrA (z ang. high temperature requirement A) (Poquet *i wsp.*, 2000). Białko to zawiera reszty katalityczne oraz, odpowiedzialne za rozpoznanie substratu, domeny PDZ, zlokalizowane na końcu karboksylowym (Pallen i Wren, 1997). HtrA posiada aktywność zarówno proteolityczną jak i czaperonową, zmieniając się w zależności od temperatury (Spiess *i wsp.*, 1999). W optymalnych temperaturach wzrostu konformacja białka maskuje centrum proteolityczne, uniemożliwiając wiązanie substratu i katalizę. W podwyższonych temperaturach konformacja HtrA ulega zmianie i część katalityczna staje się dostępna dla substratu, a białko uzyskuje właściwości proteolityczne (Krojer *i wsp.*, 2002). HtrA odpowiedzialny jest za podtrzymywanie wzrostu bakterii poprzez degradację źle sfałdowanych białek, zgromadzonych w wyniku wstrząsu cieplnego. Fragmenty powstałe w wyniku aktywności proteolitycznej HtrA prawdopodobnie stanowią sygnał indukujący odpowiedź na stres cieplny (Wonderling *i wsp.*, 2004). Białko to odgrywa istotną rolę nie tylko w przeżywalności *L. monocytogenes* w warunkach stresu cieplnego, ale także w warunkach stresu osmotycznego, oksydacyjnego oraz obniżonego pH (Stack *i wsp.*, 2005;

Sleator *i wsp.*, 2005; Wilson *i wsp.*, 2006). HtrA niezbędne jest także dla wirulencji patogenu (Stack *i wsp.*, 2005; Wilson *i wsp.*, 2006). Ekspresja genu *htrA* regulowana jest przez dwuskładnikowy regulatorowy system LisRK. Komponent HK, kodowany przez gen *lisK*, stanowi kinaza histydynowa. Jest ona związana z membraną i może monitorować zmiany w środowisku zewnętrznym. Komponent RR, kodowany przez gen *lisR*, stanowi cytoplazmatyczny regulator odpowiedzi na stres cieplny (Parkinson, 1993). Regulator LisRK zaangażowany jest również w odpowiedź na stres oksydacyjny oraz niskie pH. Ponad to warunkuje tolerancję na etanol, wzrost w obecności czynników antybakteryjnych oraz wirulencję *L. monocytogenes* (Cotter *i wsp.*, 1999; Kallipolitis i Ingmer, 2001; Cotter *i wsp.*, 2002).

1.7. Sigma B, rola w odpowiedzi na stres oraz w wirulencji *L. monocytogenes*

Główny mechanizm zapewniający *L. monocytogenes* przetrwanie niekorzystnych warunków środowiskowych, oparty jest na działaniu alternatywnych czynników transkrypcyjnych sigma. Pojawiają się one w warunkach stresu i biorą udział w modyfikacji transkrypcji wielu genów, co odbywa się poprzez ich asocjację z rdzeniem polimerazy RNA (Boor, 2006). Czynniki sigma są podjednostkami polimerazy RNA. Wiążąc się z rdzeniem polimerazy formują one kompleks odpowiedzialny za rozpoznanie sekwencji promotorowej, rozdzielanie helisy DNA oraz inicjację transkrypcji (Kazmierczak *i wsp.*, 2005). Alternatywne czynniki sigma rozpoznają inne promotory niż czynniki standardowe, działające w optymalnych warunkach wzrostu. Indukują one transkrypcję genów nie ekspresjonowanych zwykle w normalnych warunkach (Boor *i wsp.*, 2006, Wałęcka *i wsp.*, 2009). Czynniki sigma zaliczono do dwóch niespokrewnionych rodzin, tj. σ^{70} i σ^{54} . σ^{54} , zwany też σ^N , zaangażowany jest w metabolizm azotu i reguluje ekspresję genów związanych z wirulencją bakterii. Ze względu na strukturę i funkcję czynniki sigma należące do rodziny σ^{70} , zostały podzielone na cztery grupy. Grupa I obejmuje czynniki zaangażowane we wzrost bakterii i metabolizm w warunkach normalnych. Grupa II i IV zawiera alternatywne czynniki sigma, regulujące odpowiednio ekspresję genów warunkujących utrzymanie stabilności komórki w stacjonarnej fazie wzrostu oraz genów reagujących na kumulację nieprawidłowo sfałdowanych białek w peryplazmie. Grupę III (σ^B) stanowią czynniki zaangażowane w odpowiedź na stres, sporulację oraz syntezę flagelli (Paget i Helmann, 2003; Kazmierczak *i wsp.*, 2005; Boor *i wsp.*, 2006).

Najlepiej poznanym alternatywnym czynnikiem sigma u *L. monocytogenes* jest σ^B (van Schaik i Abee, 2005; Kazmierczak *i wsp.*, 2005). Gen kodujący ten czynnik (*sigB*) jest siódmym genem w operonie, złożonym z ośmiu genów, regulujących ekspresję σ^B (*rsbR*, *rsbS*, *rsbT*, *rsbU*, *rsbV*, *rsbW*, *sigB*, *rsbX*) (Ferreira *i wsp.*, 2004). σ^B aktywowany jest w odpowiedzi na niedobór składników odżywczych i stres środowiskowy. W aktywacji σ^B , opartej na kaskadzie fosforylacji i defosforylacji uczestniczą białka Rsb (Chaturongakul i Boor, 2004). W optymalnych warunkach wzrostu σ^B utrzymywany jest w formie nieaktywnej poprzez interakcję z czynnikiem RsbW. W warunkach stresu nieufosforylowana forma czynnika RsbV wiąże RsbW uwalniając σ^B . U *Bacillus subtilis* fosforylacja RsbV regulowana jest przez dwie różne fosfatazy. W warunkach niedoboru składników odżywczych RsbQ aktywuje RsbP, które z kolei aktywuje RsbV. W warunkach stresu środowiskowego następuje aktywacja RsbU z udziałem stresosomu, złożonego z RsbS, RsbR i paralogów RsbR, tj. YkoB, YojH, YqhA i YtvA. W warunkach stresu domeny stresosomu ulegają fosforylacji przez kinazę RsbT, tym samym uwalniając RsbT z kompleksu. Ostatecznie RsbT aktywuje RsbU, co prowadzi do uwolnienia sigmaB (Kazmierczak *i wsp.*, 2005; Marles-Wright i Lewis, 2007). U *L. monocytogenes* nie zidentyfikowano operonu *rsbQ-rsbP*, tak więc aktywacja σ^B zachodzi prawdopodobnie niezależnie od rodzaju stresu z udziałem RsbT, RsbU, RsbV oraz RsbW (**Ryc. 5**).



Ryc. 5. Aktywacja σ^B u *L. monocytogenes* i *B. subtilis* w warunkach stresu środowiskowego oraz w warunkach niedoboru składników odżywczych. W optymalnych warunkach wzrostu σ^B utrzymywany jest w formie nieaktywnej poprzez interakcję z czynnikiem RsbW. W warunkach stresu nieufosforylowana forma czynnika RsbV wiąże RsbW uwalniając σ^B . U *B. subtilis* RsbV ulega defosforylacji przy udziale fosfatazy RsbP lub RsbU, w zależności od stresu. W warunkach niedoboru składników odżywczych RsbQ aktywuje RsbP, co

prowadzi do aktywacji RsbV. W warunkach stresu środowiskowego kinaza RbsT fosforyluje domeny STAS stresosomu i uwalniana jest z kompleksu. Następnie RsbT aktywuje RsbU, który z kolei odpowiedzialny jest za defosforylację RsbV. U *L. monocytogenes* aktywacja σ^B zachodzi niezależnie od rodzaju stresu przy udziale RsbT, RsbU, RsbV oraz RsbW.

W komórkach *L. monocytogenes* zidentyfikowano 54 genów potencjalnie zależnych od σ^B (Kazmierczak *i wsp.*, 2003). Wykazano, iż σ^B kontroluje ekspresję genów warunkujących przeżywalność w warunkach stresowych, jak wysoka osmolarność, obniżona i podwyższona temperatura, niskie pH, wysokie ciśnienie hydrostatyczne, wysokie stężenie etanolu oraz stres oksydacyjny (Ferreira *i wsp.*, 2001).

Potencjalne sekwencje promotorowe zależne od σ^B zlokalizowano w genach *opuC* i *gbuAP2*. Wykazano, iż mutanty delecyjne *sigB*, narażone na wstrząs osmotyczny odznaczają się niższym poziomem transkryptów *opuCA* i nie są zdolne do wykorzystywania karnityny oraz betainy jako osmoprotektantów. Potwierdza to udział sigma B w odpowiedzi na stres osmotyczny (Becker *i wsp.*, 1998; Fraser *i wsp.*, 2003; Sue *i wsp.*, 2004). Zbadano także udział σ^B w tolerancji na podwyższone temperatury. Badania mutantów σ^B wykazały brak korelacji między ciepłoopornością a obecnością tego czynnika, co sugeruje, iż ciepłooporność jest przynajmniej częściowo niezależna od σ^B (Ferreira *i wsp.*, 2001). Wyniki innych badań sugerują jednak, że σ^B może być zaangażowany w tolerancję na wysokie temperatury (Somolis *i wsp.*, 2010). Identyfikacja potencjalnej sekwencji promotorowej zależnej od σ^B , w genie *clpP* wydaje się potwierdzać udział czynnika w odpowiedzi na stres cieplny (Wemekamp-Kamphuis *i wsp.*, 2004).

σ^B odgrywa również rolę w warunkach stresu oksydacyjnego (Ferreira *i wsp.*, 2001), niskiego pH (Wiedmann *i wsp.*, 1998; Ferreira *i wsp.*, 2001; Wemekamp-Kamphuis *i wsp.*, 2004), ograniczonego dostępu składników odżywczych (Lungu *i wsp.*, 2008) oraz niskiej temperatury (Moorhead i Dykes, 2003; Becker *i wsp.*, 2000).

σ^B wpływa także na wirulencję *L. monocytogenes*. Wykazano, że poziom transkryptów genów *bsh* i *inlAB* istotnie spada w komórkach mutantu *sigB*, poddanego działaniu stresu osmotycznego, wskazując na udział σ^B w kontroli ekspresji genów związanych z wirulencją *L. monocytogenes* (Kazmierczak *i wsp.*, 2003). Hydrolaza soli żółciowych (Bsh), kodowana przez gen *bsh*, jest uznawana za czynnik wirulencji umożliwiający bakterii przetrwanie w obecności soli żółciowych, ułatwiający kolonizację jelita, natomiast InlA i InlB są białkami niezbędnymi do inwazji różnego rodzaju nefagocytujących komórek u ssaków (Dussurget *i wsp.*, 2002; Bierne *i wsp.*, 2007). W obrębie locus *inlAB* zidentyfikowano 6 promotorów, w

tym 1 promotor zależny od PrfA (P3inlA) oraz 2 promotory zależne od σ^B (P4inlA, P2inlB) (Kazmierczak *i wsp.*, 2003; Lingnau *i wsp.*, 1995). σ^B może regulować transkrypcję *inlAB* również nie bezpośrednio, a poprzez kontrolę ekspresji *prfA* (Kim *i wsp.*, 2005). PrfA jest kluczowym czynnikiem regulującym ekspresję genów wirulencji. Jego aktywacja następuje po wnikięciu bakterii do komórki gospodarza (Garner *i wsp.*, 2006). Czynnikiem ten reguluje każdy etap rozprzestrzeniania się *L. monocytogenes* wewnątrz komórek eukariotycznych. PrfA kontroluje ekspresję białek odpowiedzialnych za ucieczkę z fagosomu tj. LLO, PlcA, PlcB, Mpl oraz białka ActA niezbędnego do przemieszczania się patogenu w kierunku sąsiednich komórek (Engelbrecht *i wsp.*, 1996; Portnoy *i wsp.*, 2002). Wykazano, że jeden z promotorów genu *prfA* jest kontrolowany przez σ^B (Freitag *i wsp.*, 1993). W trakcie inwazji *L. monocytogenes* uruchamia kolejno czynniki umożliwiające jej przetrwanie w komórce gospodarza oraz rozprzestrzenianie w tkankach. Uważa się obecnie, że wnikięciu do komórek eukariotycznych towarzyszy zmiana ekspresji genów niezbędnych do przeżycia w trakcie kolonizacji przewodu pokarmowego, będących pod przeważającą kontrolą σ^B , na ekspresję genów zależnych od PrfA, wymaganych do ucieczki z fagosomu, namnażania w cytozolu i rozprzestrzeniania w tkankach (Kazmierczak *i wsp.*, 2006). σ^B pełni przypuszczalnie nadrzędną rolę w regulacji wirulencji *L. monocytogenes* biorąc jednocześnie udział w kolonizacji przewodu pokarmowego oraz inwazji komórek gospodarza. Delecja genu *sigB* prowadzi do znaczącego spadku ekspresji *inlA* i *inlB*, redukując zdolność *L. monocytogenes* do wnikania do linii komórkowej CaCo-2 i HepG2 oraz przeżywalność *in vivo* (Garner *i wsp.*, 2006; Kim *i wsp.*, 2005; Kim *i wsp.*, 2004). Wydaje się jednak, że czynnik ten nie wpływa na replikację i przeżywalność bakterii w organizmach zwierzęcych infekowanych podskórnym, kiedy bakterie znajdują się w cytozolu komórek gospodarza, gdy PrfA jest w pełni aktywny (Garner *i wsp.*, 2006; de las Heras *i wsp.*, 2011). Rola sigma B wydaje się być najistotniejsza w stadium kolonizacji przewodu pokarmowego. Czynnikiem ten z jednej strony uczestniczy w regulacji genów ułatwiających bakterii przetrwanie niekorzystnych warunków panujących w przewodzie pokarmowym, a z drugiej moduluje ekspresję internalin, wpływając w ten sposób na proces wnikania patogenu do komórek eukariotycznych (de las Heras *i wsp.*, 2011).

2. CEL PRACY

L. monocytogenes zarówno w środowisku zewnętrznym jak i w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt napotyka na szereg niekorzystnych dla jej wzrostu czynników. Procesy obróbki cieplnej stanowią jedną z najpowszechniejszych metod redukcji liczby drobnoustrojów w trakcie utrwalania żywności. Podwyższone ciśnienie osmotyczne jest czynnikiem napotykanym przez patogen w środowisku żywności oraz w trakcie kolonizacji przewodu pokarmowego. Do czynników wyzwalających odpowiedź na stres należą także wahania stężenia substancji odżywczych związane ze zmianą zagęszczenia populacji, odczuwane zwłaszcza w momencie przejścia kolonii w fazę wzrostu stacjonarnego. W niekorzystnych warunkach środowiskowych *L. monocytogenes* inicjuje odpowiedź na stres. Odpowiedź ta wiąże się ze zmianą metabolizmu bakterii, realizowanego poprzez ekspresję specyficznego zestawu genów. Uruchomienie tej odpowiedzi prowadzi do wytworzenia białek umożliwiających łagodzenie wpływu czynników stresowych. Od niedawna wiadomo, że w reakcji na stres bakterie mogą nie tylko zwiększać swą odporność na kolejne dawki czynników stresowych, ale także zmieniać swoją wirulencję. Dzieje się tak w wyniku oddziaływania głównego alternatywnego czynnika transkrypcyjnego uruchamianego w odpowiedzi na stres tj. sigma B na geny odpowiedzialne za wirulencję *L. monocytogenes*. Wirulencja *L. monocytogenes* znacznie różni się pomiędzy szczepami. Szacuje się, że nawet 21% populacji *L. monocytogenes* stanowić mogą szczepy niewirulentne oraz szczepy o obniżonej wirulencji. Niewiele wiadomo na temat zmian wirulencji w odpowiedzi na stres w różnych szczepach *L. monocytogenes*, zmian wirulencji *L. monocytogenes* w zależności od gęstości kolonii bakteryjnej oraz zmian wirulencji *L. monocytogenes* w zależności od rodzaju i natężenia czynnika stresowego

Dlatego też, celem podjętych badań było określenie wpływu gęstości kolonii bakterii, zwiększonego ciśnienia osmotycznego oraz podwyższonej temperatury na inwazyjność szczepów *L. monocytogenes*.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiały

3.1.1. Odczynniki

Odczynniki chemiczne	Producent
Agaroza	PRONA
Alkohol etylowy	POCH
Alkohol izoamylowy	POCH
Alkohol izopropylowy	CHEMPUR
Bromek etydyny	SIGMA
Chloroform	CHEMPUR
Chlorowodorek guanidyny	FLUKA
DNaza	SIGMA
Fenol	CARL ROTH GMBH
Lizozym	FLUKA
SDS	SIGMA
TRI Reagent	SIGMA
Tris	SERVA

Odczynniki do PCR	Producent
Polimeraza DNA Taq	FERMENTAS
IQ SuperMix	BIO RAD
Startery	GENOMED
dNTP	FERMENTAS
Chlorek magnezu	FERMENTAS

3.1.2. Podłoża mikrobiologiczne

Płynne podłoże BHI		Stałe podłoże BHI	
	g/L		g/L
wyciąg z mózgu cielęcego	12,5	wyciąg z mózgu cielęcego	12,5
wyciąg z serca wołowego	5,0	wyciąg z serca wołowego	5,0
pepton z tkanek zwierzęcych	10,0	pepton z tkanek zwierzęcych	10,0
glukoza	2,0	glukoza	2,0
NaCl	5,0	NaCl	5,0
Fosforan dwusodowy	2,5	Fosforan dwusodowy	2,5
		Agar	15,0

3.1.3. Aparatura

Urządzenie	Producent
Aparat do elektroforezy DNA (Sub-Cell 192)	BioRad
Aparat GelDoc XR System	BioRad
Aparat do Real-Time PCR IQ5	BioRad
Inkubator CO ₂	Sanyo
Komora laminarna klasy Biohazard	Euroclone
Łaźnia wodna	AJL Electronic
Mikroskop odwrócony	Optech
Wirówka z chłodzeniem	Eppendorf
Inkubator z wytrząsaniem	New Brunswick

3.1.4. Oprogramowanie

Program	Producent
Bioedit	program dostępny <i>on line</i> (mbio.ncsu.edu/BioEdit)
MEGA wersja 3.1	Kumar i wsp. (2004).
Molecular Beacon Software	BioRad, Polska
Quantity One	BioRad, Polska
Statistica	Statsoft, Polska

3.1.5. Szczepy bakterii

Dziesięć szczepów *L. monocytogenes*, w tym 3 szczepy kliniczne (L28, L41, L84) i 7 pochodzących z żywności (L4, L45, L56, L71, L83, L1057, L2061) uzyskano dzięki uprzejmości dr Renaty Karpíškovej (Międzynarodowy Instytut Zdrowia Publicznego, Praga) i dr Jarosława Paciorka (PZH, Warszawa).

3.1.6. Linia komórek eukariotycznych

Testy prowadzono na linii ludzkiego raka okrężnicy HT-29. Linię otrzymano z kolekcji Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu. Komórki hodowano w medium DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Sigma-Aldrich, Poznań) z dodatkiem 10% inaktywowanej bydlęcej surowicy (Gibco, Warszawa), 2 mM glutaminy, 100 IU/mL penicyliny i 100 µg/MI streptomycyny (Sigma-Aldrich), w 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO₂.

3.2. Metody

3.2.1. Hodowla bakterii i wyznaczenie krzywej wzrostu

Bakteriami z pojedynczych kolonii uzyskanymi w wyniku posiewu redukcyjnego na płytkach agarowych z BHI inokulowano 5 mL bulionu BHI i inkubowano w 37°C, przy 180 obr./min. przez 8 godzin. Następnie 10 µL zawiesiny bakteryjnej przenoszono do 50 mL BHI i inkubowano kolejne 12 godzin. Pięćdziesiąt mikrolitrów z tych hodowli przenoszono do 5 mL BHI i hodowano w 37°C wytrząsając przy 220 obr./min. od 2 do 24 godzin. W celu wyznaczenia zależności gęstości optycznej od czasu oraz zależności liczby bakterii od czasu z hodowli pobierano 100 µL zawiesiny bakteryjnej w czasie 0, 2, 3, 4, 5, 6, 10 oraz 24 godziny. W pobranych próbkach dokonywano pomiaru gęstości przez określenie absorpcji przy długości fali 600 nm. Równolegle bakterie poddane kolejnym rozcieńczeniom dziesiętnym wysiewano na płytki BHI z agarem. Po 24 godzinnej hodowli w 37°C określano ich liczbę. Wykreślono zależność gęstości populacji przy długości fali 600 nm oraz liczby bakterii od czasu.

3.2.2. Hodowla bakterii w celu określenia wpływu stresu osmotycznego na inwazyjność szczepów *L. monocytogenes*

Bakterie hodowano jak w punkcie 3.2.1. Jeden mililitr zawiesiny bakteryjnej wprowadzano do równej objętości BHI zawierającego 0.6- 3.6 M chlorek sodu, tak by otrzymać końcowe stężenie: 0.3, 0.8 oraz 1.8 M NaCl, a następnie inkubowano przez 10

minut lub 1 godzinę w 37°C. Bakterie poddane działaniu NaCl oraz bakterie kontrolne, nie traktowane NaCl, w liczbie 2 do 4 log j.t.k. wykorzystywano do infekcji komórek HT-29.

3.2.3. Hodowla bakterii w celu określenia wpływu stresu cieplnego na inwazyjność szczepów *L. monocytogenes*

Bakterie hodowano jak w punkcie 3.2.1. Jeden mililitr zawiesiny bakteryjnej inkubowano w łaźni wodnej w 54°C przez 20 lub 60 minut. Bakterie poddane działaniu podwyższonej temperatury oraz nie ogrzewane bakterie kontrolne, w liczbie 2 do 8 log j.t.k. wykorzystywano do infekcji linii HT-29.

3.2.4. Hodowla szczepów *L. monocytogenes* w zbuforowanym BHI

Bakteriami z pojedynczych kolonii uzyskanymi w wyniku posiewu redukcyjnego na płytkach agarowych z BHI inokulowano 5 mL BHI zbuforowanego do pH 7.0 za pomocą roztworu zawierającego 0.4 M Na₂HPO₄ oraz 0.2 M cytrynian sodowy i inkubowano przez 8 godzin w 37°C, przy 180 obr/min. Następnie 10 µL zawiesiny bakteryjnej przenoszono do 50 mL zbuforowanego bulionu i inkubowano kolejne 12 godzin. Pięćdziesiąt mikrolitrów hodowli bakteryjnej przenoszono do 5 mL świeżego zbuforowanego BHI i inkubowano do osiągnięcia fazy wzrostu logarytmicznego (OD₆₀₀ 0.4 - 0.6) oraz fazy wzrostu stacjonarnego (OD₆₀₀ 2.8 - 3.5).

3.2.5. Test tworzenia łąsinek

Komórki HT-29 w liczbie około 400 000 tysięcy/dolek wysiewano do 6-dolekowych płytek i inkubowano do osiągnięcia ok. 90% zagęszczenia. Dzień przed infekcją zmieniano medium na DMEM bez dodatku antybiotyków. Zawiesinę bakterii poddanych działaniu czynnika stresowego oraz zawiesinę bakterii kontrolnych dodawano do hodowli komórek HT-29 i inkubowano przez 2h. Następnie dwukrotnie przepłukiwano studzienki za pomocą PBS (Sigma-Aldrich), zmieniano medium na DMEM zawierający 100 µg/mL gentamycyny (Sigma-Aldrich) i inkubowano przez 1.5 godziny. Medium z gentamycyną usuwano, a do dołeków płytek dodawano medium zawierające 10 µg/mL gentamycyny oraz 1.0% agarozę o niskim punkcie topnienia (Prona, Gdańsk). Po 48-72 godzinach określano liczbę łąsinek.

Oznaczenia w każdym z warunków eksperymentalnych przeprowadzano trzykrotnie w dwóch powtórzeniach w obrębie eksperymentu.

Inwazyjność bakterii określano jako iloraz liczby łąsinek, wyrażających liczbę bakterii, które wniknęły do komórek HT-29 oraz liczby bakterii wprowadzanych do studzienek. Efekt stresu, określony mianem indukcji, określano jako iloraz inwazyjności bakterii poddanej działaniu czynnika stresowego oraz inwazyjności bakterii kontrolnych, wyrażony w procentach.

3.2.6 Izolacja genomowego DNA

Osady bakterii otrzymane z 2 mililitrów hodowli zawieszano w 100 μ L 0.1M Tris-HCl o pH 7.4, zawierającym 2 μ g/mL lizozymu i inkubowano przez 15 minut w 37°C. Następnie dodano 10 μ L 10% SDS. Po 15 minutach dodawano 200 μ L 5 M chlorowodoru guanidyny i przedłużono inkubację o kolejne 5 minut. Następnie dodawano mieszaninę fenolu z chloroformem i alkoholem izoamylovym w stosunku objętościowym 25/24/1. Po minutowym wytrząsaniu wirowano je przez 5 minut przy 14 000 \times g. Fazę wodną przenoszono do nowej próbówki i wytrącano z niej DNA za pomocą równej objętości alkoholu izopropylowego. Próby wirowano przez 5 minut przy 14 000 \times g, zlewano płyn z nad osadu i przemywano osad 1 mL 70% etanolu. Po kolejnym wirowaniu, zlewano płyn z nad osadu, a osad po wysuszeniu zawieszano w 30 μ L wody.

3.2.7. Izolacja RNA

Osady bakterii otrzymane z 2 mililitrowej hodowli zawieszono 100 μ L 0.1M Tris-HCl o pH 7.4, zawierającym 2 μ g/mL lizozymu i inkubowano 15 minut w 37°C. Następnie dodawano 1 mL odczynnika TRI (Sigma-Aldrich) i osad bakterii zawieszano przez intensywne pipetowanie. Mieszaninę inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej i dodawano do niej 200 μ L chloroformu, następnie wirowano przez 15 minut w 4°C przy 12 000 \times g. Fazę wodną przenoszono do nowej próbówki i wytrącano RNA przez dodanie równej objętości alkoholu izopropylowego. Próby wirowano przez 10 minut w 4°C przy 12 000 \times g, zlewano płyn z nad osadu i przemywano osad 1 mL 70% etanolu. Po kolejnym wirowaniu, zlewano płyn z nad osadu, a osad po wysuszeniu zawieszano w 20 μ L wody.

3.2.8. Określenie genotypu *actA*

Amplifikacji poddano fragment genu *actA* o długości 827 par zasad od końca 3'. PCR prowadzono w objętości 25 μ L w mieszaninie zawierającej 1 jednostkę termostabilnej polimerazy Taq DNA (Fermentas), 10 mM buforu Tris-HCl o pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Tritonu X-100, oraz 200 nM starterów dla *actA* (Zhou i wsp. 2004) o sekwencjach: starter sensowny (5'-GCTGATTTAAGAGATAGAGGAACA-3'), starter antysensowny (5'-TTTATGTGGTTATTTGCTGTC-3'). Amplifikacja obejmowała 40 cykli według następującego schematu: 30 sekund w 94°C, 30 sekund w 50°C oraz 1 minuta w 72°C. Produkty PCR sekwencjonowano (Genomed). Fragment o wielkości 597 nukleotydów od końca 3' analizowano za pomocą programu BioEdit. Dendrogram podobieństwa filogenetycznego sporządzono za pomocą programu MEGA 3.1 (Kumar i wsp. 2004) stosując metodę sąsiednich połączeń.

3.2.9. Określenie serotypu za pomocą multiplex PCR

PCR prowadzono w objętości 25 μ L w mieszaninie zawierającej 1 jednostkę termostabilnej polimerazy Taq DNA (Fermentas), 10 mM buforu Tris-HCl o pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Tritonu X-100, 1 μ M starterów lmo0737, ORF2819, ORF2110, 1.5 μ M startera lmo1118 oraz 200 nM startera prs (Tabela 1) (Doumith i wsp. 2004). Amplifikacja obejmowała 35 cykli według następującego schematu: 40 sekund w 94°C, 45 sekund w 51°C oraz 1.5 minuty w 72°C.

Tabela 1. Startery użyte do określenia serotypu *L. monocytogenes*

Gen	Starter sensowny	Starter antysensowny
lmo737	AGGGCTTCAAGGACTTACCC	ACGATTTCTGCTTGCCATTC
lmo118	AGGGGTCTTAAATCCTGGAA	CGGCTTGTTCCGGCATACTTA
ORF2819	AGCAAAAATGCCAAAACCTCGT	CATCACTAAAGCCTCCCATTG
ORF2110	AGTGGACAATTGATTGGTGAA	CATCCATCCCTTACTTTGGAC
prs	GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG	CAAAGAAACCTTGGATTGCGG

3.2.10. Odwrotna transkrypcja i PCR w czasie rzeczywistym

1 µg RNA trawiono przez 1 godzinę w 37°C w buforze zawierającym 1 jednostkę DNAzy wolnej od RNAzy (Sigma-Aldrich). Następnie przeprowadzono syntezę cDNA stosując oligonukleotydy typu random hexamer i odwrotną transkryptazę Superscript III, zgodnie z instrukcją producenta (Invitrogen). W celu określenia skuteczności trawienia preparatu RNA za pomocą DNAzy przygotowywano trawioną DNAzą próbę, do której nie dodano odwrotnej transkryptazy. Względny poziom transkryptów *inlA*, *inlB* oraz *opuCA* określano za pomocą urządzenia iQ5 Optical System (BioRad, Warszawa). Normalizacji ilości transkryptów genów badanych dokonywano w stosunku do poziomu transkryptu genu podstawowego metabolizmu *gap* kodującego dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Startery do amplifikacji fragmentu genu *gap* zostały zaprojektowane na podstawie analizy sekwencji genu *gap*, przy użyciu programu Molecular Beacon (BioRad) (Tabela 2.).

Każdy PCR przeprowadzany był w dwóch powtórzeniach, z trzech niezależnych preparacji RNA. PCR prowadzono w objętości 20 µL w mieszaninie zawierającej 1 µL cDNA, 450 nM starterów *gap* lub 900 nM starterów *inlA*, *inlB* i *opuCA* oraz 18 µL iQ SYBR Green Supermix (BioRad). Amplifikacja obejmowała 35 cykli składających się z etapu denaturacji prowadzonej przez 30 sekund w 95°C, przyłączania starterów prowadzonego przez 30 sekund w 60°C oraz elongacji prowadzonej przez 45 sekund w 72°C, poprzedzonych wstępną denaturacją w 95°C przez 3 minuty. Specyficzność każdej reakcji była kontrolowana na podstawie analiz krzywych topnienia, prowadzonych w temperaturach od 90 do 50°C. Aby określić stopień zanieczyszczenia preparatów RNA genomowym DNA każdy PCR przeprowadzano równolegle dla cDNA oraz trawionego DNAzą preparatu do którego nie dodano odwrotnej transkryptazy. Wydajność PCR określano niezależnie dla każdej pary starterów wykorzystując jako matrycę szereg 5-krotnych jej rozcieńczeń. Wydajność obliczano wykreślając zależność otrzymanych sygnałów od stopnia rozcieńczenia matrycy. Względny poziom badanych transkryptów obliczano uwzględniając wyznaczone wydajności PCR zgodnie z metodyką zaproponowaną przez Pfaffl (2001).

Tabela 2. Startery do określania ekspresji czynników wirulencji i genu odpowiedzi na stres *L. monocytogenes*.

Gen	Starter sensowny	Starter antysensowny	Referencje
<i>gap</i>	TGGTGTTGTTGAAGGTCTAATG	GCAGCTCCGTCTAATTTACC	Wałęcka i wsp. 2011
<i>inlA</i>	GAACCAGCTAAGCCIGTAAAAG	CGCCIGTTTGGGCATCA	Werbrouck i wsp. 2006
<i>inlB</i>	GGAAAAGCAAAAGCAIGATTTC	TCCATCAACATCATAACTTACTGTGTAATA	Werbrouck i wsp. 2006
<i>opuCA</i>	ACATCGATAAAGGAGAATTTGTTTGTT	GCCGGTTAATCATCTTCATTGTT	Sue i wsp. 2004

3.2.11. Analiza statystyczna

Każdy eksperyment wykonywano w co najmniej trzech powtórzeniach. Poziom istotności różnic pomiędzy danymi eksperymentalnymi, określano za pomocą analizy wariancji dla układów czynnikowych (ANOVA) oraz analizy dla układów z powtarzanymi pomiarami, wykorzystując test Najmniejszej Istotnej Różnicy Fishera. Za znaczące uznawano wartości poziomu istotności testu, gdy $p < 0.05$. Analizy wykonano za pomocą oprogramowania Statistica (StatSoft, Polska).

4. WYNIKI

4.1. Określenie genotypu *actA* oraz przynależności do serogrup 10 szczepów *L. monocytogenes*

Analiza PCR zgodnie z Doumith i wsp. 2004 pozwoliła na zaliczenie 3 szczepów *L. monocytogenes* do serogrupy 1/2a (3a), 2 szczepów do serogrupy 1/2b (3b), 1 szczepu do serogrupy 1/2c (3c), 2 szczepów do serogrupy 4b (d,e) oraz 2 szczepów do serogrupy 4c (a). Na podstawie analizy fragmentów sekwencji genu *actA*, o wielkości 597 pz, zgodnie z Zhou i wsp. (2005), 4 szczepy *L. monocytogenes* zaklasyfikowano do genotypu I, 4 do genotypu II i 2 do genotypu III (Tabela 3).

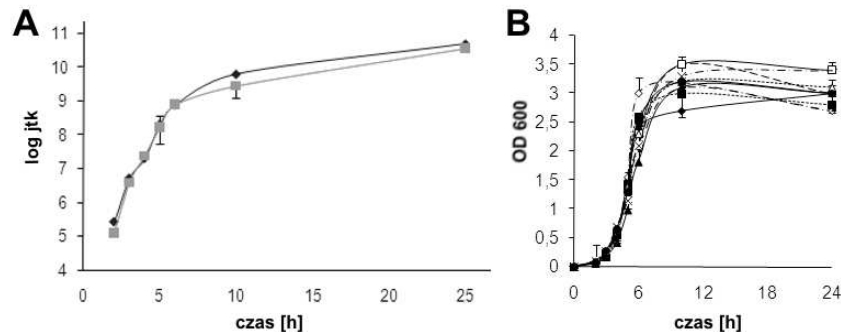
Tabela 3. Szczepy *L. monocytogenes* wykorzystane w pracy

Numer szczepu	Źródło	Genotyp <i>actA</i>	Serogrupa
L28	Ludzie	I	4b (d,e)
L84	Ludzie	I	4b (d,e)
L41	Ludzie	I	1/2b (d,e)
L45	Żywność	I	1/2b (d,e)
L56	Żywność	II	1/2a (3a)
L71	Żywność	II	1/2a (3a)
L83	Żywność	II	1/2a (3a)
L1057	Żywność	II	1/2c (3c)
L4	Żywność	III	4c (a)
L2061	Żywność	III	4c (a)

4.2. Określenie wpływu gęstości optycznej hodowli na inwazyjność 10 szczepów *L. monocytogenes*

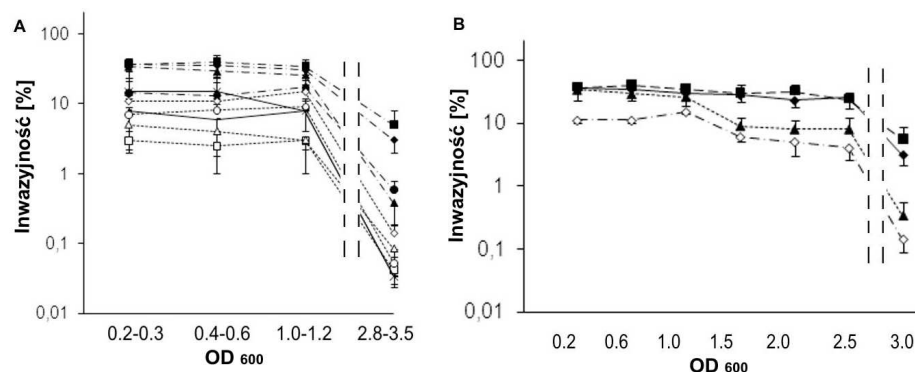
Na podstawie analizy zależności liczby bakterii od czasu hodowli sporządzonej dla dwóch szczepów (L28 i L56) wyznaczono wartości OD₆₀₀ odpowiadające fazie logarytmicznego wzrostu w zakresie od 0.2 - 1.5 osiąganą po upływie 3 – 5 godzin, fazie

spowolnienia w zakresie 2.0 - 2.5 osiąganą po upływie ok. 6 godzin i fazy stacjonarnej w zakresie 2.8 - 3.5 osiąganą po upływie ok. 10 godzin. Po upływie 18 godzin wartość OD₆₀₀ hodowli bakterii nie ulegała zmianie (Ryc. 1).



Ryc. 1. A. Zależność liczby bakterii od czasu hodowli dla dwóch szczepów *L. monocytogenes*: L28♦, L56□ B. zależność OD₆₀₀ od czasu hodowli dla 10 szczepów *L. monocytogenes*: L84■, L45▲, L41●, L28♦, L71○, L56◇, L83Δ, L1057□, L4- oraz L2061×

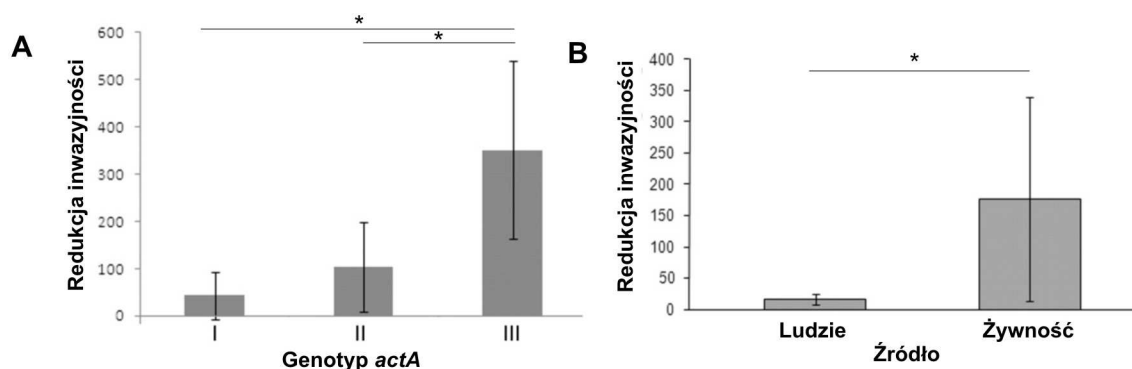
Szczepy *L. monocytogenes* hodowano do osiągnięcia OD₆₀₀: 0.2-0.3, 0.4-0.6, 1.0-1.2, a także przez kolejne 8 godzin po osiągnięciu fazy stacjonarnej (łącznie 18 godzin hodowli, OD₆₀₀ 2.8 – 3.5), a następnie określono ich inwazyjność. W żadnym z badanych szczepów nie stwierdzono istotnych różnic w inwazyjności pomiędzy OD₆₀₀ 0.4 i 1.2. Znaczący spadek inwazyjności (od 10 do 400 razy) zanotowano we wszystkich szczepach w zaawansowanym stadium fazy stacjonarnej po 18 godzinach hodowli (OD 2.8-3.5), w porównaniu z bakteriami z fazy logarytmicznego wzrostu (Ryc. 2A).



Ryc. 2. Inwazyjność szczepów *L. monocytogenes* w różnych gęstościach optycznych. Szczepy L84■, L45▲, L41●, L28♦, L71○, L56◇, L83Δ, L1057□, L4- oraz L2061× inkubowano w 37°C wytrząsając przy 220 rpm do

OD₆₀₀ 0.2-0.3, 0.4-0.6, 1.0-1.2 oraz 2.8-3.5 (18 godzinna hodowla) i określano ich inwazyjność w teście tworzenia łysek (A). Cztery szczepy *L. monocytogenes*: L84■, L45▲, L28◆ oraz L56◇ hodowano do OD₆₀₀ 0.2-0.3, 0.4-0.6, 1.0-1.2, 1.5, 2.0, 2.5 oraz 2.8-3.5 (18 godzinna hodowla) i określano ich inwazyjność w teście tworzenia łysek (B). Istotny spadek ($p < 0.05$) zanotowano pomiędzy OD₆₀₀ 0.2-1.0 a 2.8-3.5 (wszystkie badane szczepy), OD₆₀₀ 0.2-1.0 a 2.5 (L45, L84) oraz OD₆₀₀ 0.2-1.0 a 1.5 (L45).

Spadek ten był najmocniej zaznaczony w szczepach należących do III genotypu *actA* (średnia redukcja 349.98 ± 184.31 razy) (Ryc. 3A) i w szczepach izolowanych z żywności (średnia redukcja 176.45 ± 163.6 razy) (Ryc. 3B). Aby określić zmiany inwazyjności w późnych etapach fazy logarytmicznej (OD₆₀₀ 1.5) oraz w fazie spowolnienia (OD₆₀₀ 2.0-2.5) zbadano inwazyjność 4 szczepów (2 wybrane szczepy z wartością indukcji powyżej 100% i 2 wybrane szczepy z wartością indukcji poniżej 100%) w zakresie wartości OD₆₀₀ od 1.5 do 2.5 (Ryc. 2B). Wykazano, że spadek inwazyjności rozpoczyna się już w fazie spowolnienia. Znaczący spadek inwazyjności w zakresie OD₆₀₀ 1.5 do 2.5 stwierdzono w 3 szczepach.

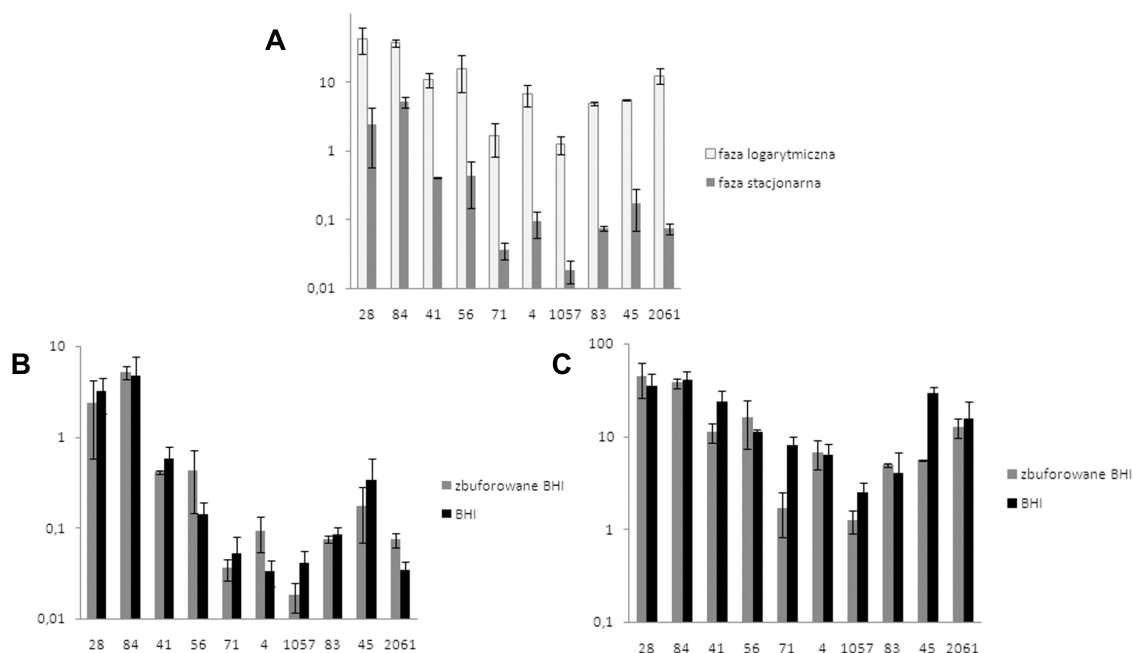


Ryc. 3. Redukcja inwazyjności pomiędzy fazą wzrostu logarytmicznego oraz fazą stacjonarną w 10 szczepach *L. monocytogenes* reprezentujących I, II lub III genotyp *actA* (A) oraz pochodzących z dwóch źródeł (B). * - $p < 0.05$.

4.3. Określenie wpływu fazy wzrostu na inwazyjność 10 szczepów *L. monocytogenes* hodowanych w zbuforowanym BHI

Stwierdzono, że zmianom gęstości optycznej towarzyszy zmiana wartości pH. Po 18 godzinach hodowli w bulionie BHI wartość pH osiągała 4.5, niezależnie od badanego szczepu *L. monocytogenes*. Aby określić wpływ fazy wzrostu, niezależnie od zmiany wartości

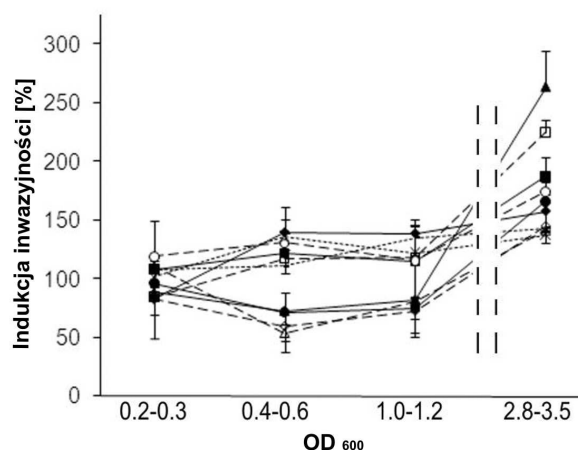
odczynu pożywki bakterie inkubowano w bulionie BHI zbuforowanym do pH 7.0 za pomocą roztworu zawierającego 0.4 M Na_2HPO_4 oraz 0.2 M cytrynian sodowy. Inwazyjność szczepów *L. monocytogenes* określono w fazie logarytmicznej w OD_{600} 0.4-0.6 oraz w zaawansowanym stadium fazy stacjonarnej po 18 godzinach hodowli (OD_{600} 2.8-3.5). Przejście z fazy logarytmicznego wzrostu do fazy stacjonarnej wywoływało we wszystkich szczepach znaczny spadek inwazyjności (od 7 do 171 razy) (Ryc. 4A). Nie zanotowano istotnych różnic w inwazyjności w fazie stacjonarnej pomiędzy szczepami hodowanymi w BHI a szczepami hodowanymi w zbuforowanym BHI (Ryc. 4B). Istotne różnice zanotowano w fazie logarytmicznego wzrostu jedynie w jednym szczepie *L. monocytogenes* (L4) (Ryc. 4C).



Ryc. 4. Porównanie inwazyjności 10 szczepów *L. monocytogenes* pomiędzy dwiema fazami wzrostu w warunkach hodowli w zbuforowanym BHI (A), pomiędzy hodowlą w BHI i zbuforowanym BHI w fazie wzrostu logarytmicznego (B) oraz pomiędzy hodowlą w BHI i zbuforowanym BHI w fazie stacjonarnej (C). Istotny spadek ($p < 0.05$) zanotowano pomiędzy dwiema fazami wzrostu w zbuforowanym BHI we wszystkich szczepach (A) oraz w szczepie L4 między BHI a zbuforowanym BHI w fazie logarytmicznego wzrostu (C).

4.4. Określenie wpływu fazy wzrostu 10 szczepów *L. monocytogenes* na odpowiedź na stres osmotyczny

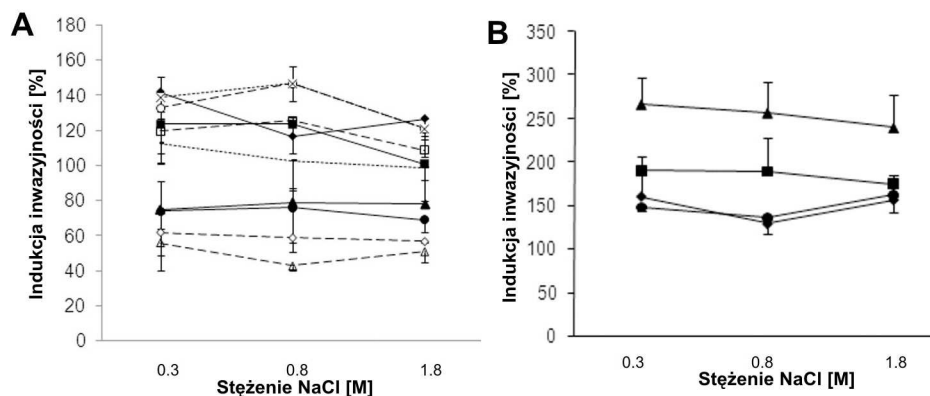
Bakterie hodowane do wartości OD₆₀₀ 0.2-0.3, 0.4-0.6 i 1.0-1.2 oraz bakterie po 18 godzinach hodowli (OD₆₀₀ 2.8-3.5) zostały poddane 10 minutowemu działaniu 0.3 M NaCl. Następnie wyznaczono inwazyjność bakterii traktowanych solą oraz bakterii kontrolnych. Wykazano, iż stres osmotyczny w zróżnicowany sposób wpływa na inwazyjność badanych szczepów *L. monocytogenes* i zależy od fazy wzrostu bakterii (Ryc. 5). Spadek inwazyjności w odpowiedzi na 0.3 M NaCl zaobserwowano w różnych stadiach fazy logarytmicznego wzrostu w 2 szczepach klinicznych (L28, L41) oraz 4 szczepach izolowanych z żywności (L45, L56, L83, L1057). Z kolei, wartości indukcji bakterii w fazie stacjonarnej wynosiły od 140% do 260%. Odchylenie standardowe (SD) wartości indukcji w 10 szczepach *L. monocytogenes*, było najniższe przy OD₆₀₀ 0.2-0.3 (SD ±13%), a najwyższe przy OD₆₀₀ 0.4-0.6 (SD ±33%). Wzrost zagęszczenia kolonii bakteryjnej z 0.2-0.3 do 0.4-0.6 prowadził do znaczącego ($p < 0.05$) wzrostu wartości indukcji w 3 szczepach: L28, L1057, L2061 (odpowiednio 56, 33 i 35%) oraz spadku indukcji w szczepie L83 (57%). Wzrost zagęszczenia kolonii w zakresie od 0.4-0.6 do 1.0-1.2 nie wpłynął w istotny sposób na wartości indukcji. Przejście bakterii z fazy wzrostu logarytmicznego (OD₆₀₀ 1.0-1.2) do fazy stacjonarnej skutkowało znaczącym spadkiem indukcji w 7 szczepach, to jest L41, L45, L84, L56, L71, L83 i L1057. Średnia wartość indukcji w fazie wzrostu logarytmicznego była najwyższa w III genotypie *actA* (124.9±17.7%), jednak istotnych statystycznie różnic między szczepami należącymi do poszczególnymi genotypów nie zanotowano (średnia wartość indukcji w genotypie I 102,2±32,07%, w genotypie II 87.05±36.4%). W fazie stacjonarnej średnia wartość indukcji wynosiła 196.5±48.15% w genotypie I, 171.5±34.8% w genotypie II oraz 142.8±15.6 w genotypie III. Statystycznie istotne różnice odnotowano pomiędzy genotypem I i III. Nie stwierdzono znaczących różnic w indukcji pomiędzy szczepami klinicznymi i pochodzącymi z żywności, zarówno w fazie wzrostu logarytmicznego (średnia wartość indukcji 109.9±31.6% dla szczepów klinicznych i 96.2±34.9% dla szczepów z żywności) jak i w fazie stacjonarnej (średnia wartość indukcji 173.4±23% dla szczepów klinicznych i 171.3±46.3 dla szczepów z żywności).



Ryc. 5. Indukcja inwazyjności 10 szczepów *L. monocytogenes* hodowanych do różnych wartości OD₆₀₀, poddanych działaniu 0.3 M NaCl. Szczepy L84■, L45▲, L41●, L28◆, L71○, L56◇, L83Δ, L1057□, L4- oraz L2061× inkubowano w 37°C z wytrząsaniem przy 220 rpm i hodowano do osiągnięcia OD₆₀₀ 0.2-0.3, 0.4-0.6, 1.0-1.2 i 2.8-3.5 (18 godzin hodowli). Bakterie poddawano działaniu 0.3 M NaCl przez 10 minut i określano ich inwazyjność w teście tworzenia łysek. Indukcję oznaczano jako iloraz inwazyjności bakterii poddanej działaniu czynnika stresowego oraz inwazyjności bakterii kontrolnych. Istotne różnice ($p < 0.05$) zanotowano pomiędzy OD₆₀₀ 0.2-0.3 a 0.4-0.6 w 3 szczepach (L28, L1057, L2061) oraz między OD₆₀₀ 1.0-1.2 a 2.8-3.5 w 7 szczepach (L41, L45, L84, L56, L71, L83 i L1057).

4.5. Określenie wpływu stężenia NaCl na przeżywalność i inwazyjność 10 szczepów *L. monocytogenes*

Szczepy w fazie wzrostu logarytmicznego (OD₆₀₀ 0.4-0.6) zostały poddane działaniu chlorku sodu o stężeniu 0.3M, 0.8 M oraz 1.8 M przez 10 minut. Wykazano, że obecność chlorku sodu w stężeniu od 0.3 do 1.8 M nie wpłynęła w istotny sposób na przeżywalność bakterii (Tabela 4). Wzrost stężenia NaCl z 0.3 do 1.8 M nie zmienił znacząco wartości indukcji 7 szczepów *L. monocytogenes*. Istotne statystycznie różnice obserwowano w szczepie L28 pomiędzy 0.3 i 0.8 M NaCl, w szczepie L71 pomiędzy 0.8 i 1.8 M NaCl oraz w szczepie L84 pomiędzy 0.3 i 1.8 M NaCl (Ryc. 6A). Zbadano także wpływ stężenia NaCl na wartość indukcji w 4 wybranych szczepach *L. monocytogenes*, analizując 2 wybrane szczepy o wartości indukcji powyżej 100% i 2 o wartości poniżej 100% w zaawansowanym stadium fazy stacjonarnej (OD₆₀₀ 2.8-3.5 po 18 godzinach hodowli). Dwa z nich cechowały się wartością indukcji w fazie wzrostu logarytmicznego powyżej 100% a dwa wartością indukcji poniżej 100%. W żadnym szczepie nie zaobserwowano istotnych różnic w wartości indukcji niezależnie od stężenia soli (Ryc. 6B).



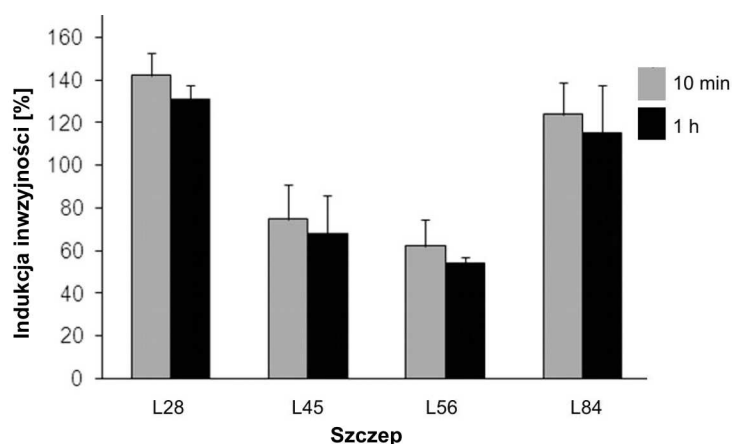
Ryc. 6. Indukcja inwazyjności 10 szczepów *L. monocytogenes* poddanych działaniu 0.3, 0.8 i 1.8 M NaCl przez 10 minut. Szczepy L84■, L45▲, L41●, L28◆, L71○, L56◇, L83Δ, L1057□, L4- i L2061× hodowano w 37°C z wytrząsaniem przy 220 rpm do OD₆₀₀ 0.4-0.6, następnie poddawano działaniu 0.3, 0.8 oraz 1.8 M NaCl przez 10 minut i określano inwazyjność w teście tworzenia łysek (A). Cztery szczepy L84■, L45▲, L41●, L28◆ hodowano do OD₆₀₀ 2.8-3.5, poddawano działaniu 0.3, 0.8 oraz 1.8 M NaCl przez 10 minut i określano inwazyjność w teście tworzenia łysek (B). Indukcję oznaczano jako iloraz inwazyjności bakterii poddanej działaniu czynnika stresowego oraz inwazyjności bakterii kontrolnych. Istotne różnice ($p < 0.05$) zanotowano pomiędzy stężeniem 0.3 a 0.8 M (L28), 0.8 a 1.8 M (L84) oraz 0.3 a 1.8 M (L84).

Tabela 4. Liczba bakterii po 10 minutach inkubacji w BHI zawierającym 0.3, 0.8 lub 1.8 M NaCl

Numer szczepu	Log JTK/ml			
	Kontrola	0.3 M NaCl	0.8 M NaCl	1.8 M NaCl
L28	7.5 ± 0.036	7.46 ± 0.098	7.52 ± 0.056	7.43 ± 0.042
L84	7.44 ± 0.49	7.42 ± 0.076	7.5 ± 0.028	7.41 ± 0.078
L41	7.5 ± 0.098	7.48 ± 0.15	7.49 ± 0.15	7.42 ± 0.063
L45	7.49 ± 0.076	7.42 ± 0.1	7.4 ± 0.063	7.47 ± 0.063
L56	7.54 ± 0.037	7.43 ± 0.028	7.5 ± 0.07	7.52 ± 0.056
L71	7.42 ± 0.025	7.42 ± 0.17	7.4 ± 0.014	7.38 ± 0.073
L83	7.53 ± 0.057	7.49 ± 0.058	7.44 ± 0.095	7.4 ± 0.16
L1057	7.4 ± 0.011	7.38 ± 0.085	7.39 ± 0.014	7.2 ± 0.001
L4	7.47 ± 0.015	7.47 ± 0.015	7.49 ± 0.028	7.37 ± 0.014
L2061	7.48 ± 0.026	7.4 ± 0.11	7.33 ± 0.049	7.38 ± 0.065

4.6. Określenie wpływu czasu działania 0.3 M NaCl na inwazyjność 4 szczepów *L. monocytogenes*

Cztery szczepy *L. monocytogenes*, w tym 2 wybrane szczepy o wartości indukcji powyżej 100% i 2 o wartości poniżej 100%, hodowano do OD₆₀₀ 0.4-0.6 i poddawano działaniu 0.3 M NaCl przez 1 godzinę. Porównując uzyskane wyniki z wartościami indukcji dla 10 minutowej ekspozycji na 0.3 M NaCl wykazano, iż czas działania soli nie wpłynął istotnie na wartość indukcji żadnego z badanych szczepów (Ryc. 7).

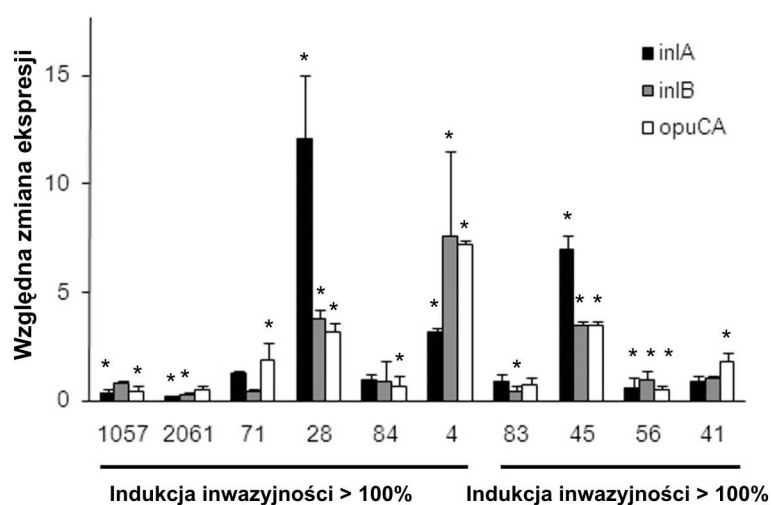


Ryc. 7. Indukcja inwazyjności 4 szczepów *L. monocytogenes* (L28, L45, L56, L84) poddanych działaniu 0.3M NaCl przez 10 minut i 1 godzinę. Bakterie hodowano w 37°C z wytrząsaniem przy 220 rpm do OD₆₀₀ 0.4-0.6, następnie poddawano działaniu 0.3 M NaCl przez 10 minut oraz 1 godzinę i określano inwazyjność w teście tworzenia łysinek. Indukcję oznaczano jako iloraz inwazyjności bakterii poddanej działaniu czynnika stresowego oraz inwazyjności bakterii kontrolnych.

4.7. Określenie względnej ekspresji *inlA*, *inlB* oraz *opuCA* w 10 szczepach *L. monocytogenes* poddanych działaniu 0.3 M NaCl przez 10 minut

W 10 szczepach *L. monocytogenes* zbadano względną ekspresję genów *inlA*, *inlB* oraz *opuCA*. Ekspresję określono w szczepach hodowanych w BHI oraz w BHI zawierającym 0.3M NaCl. Znaczący przyrost względnego poziomu transkryptu *inlA* w odpowiedzi na 10-minutową ekspozycję na 0.3M NaCl obserwowano w 2 szczepach (L28, L4) z wartością indukcji inwazyjności powyżej 100% i w 1 szczepie (L45) z wartością indukcji poniżej 100%. Znaczący spadek względnego poziomu transkryptu *inlA* zaobserwowano w 1 szczepie (L56) z wartością indukcji inwazyjności poniżej 100% oraz w 2 szczepach (L1057, L2061) z

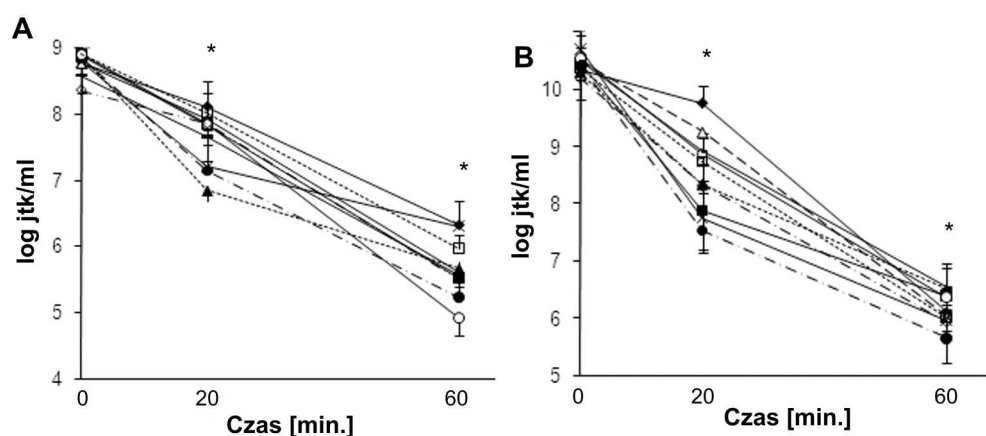
wartością indukcji powyżej 100%. Istotny wzrost ekspresji *inlB* zaobserwowano w 2 szczepach (L28, L4) z wartością indukcji powyżej 100% oraz w 1 szczepie (L45) z wartością indukcji poniżej 100%, natomiast istotny spadek ekspresji zanotowano w 1 szczepie (L83) z wartością indukcji poniżej 100% i w 1 szczepie (L2061) z wartością indukcji powyżej 100%. Znaczący wzrost poziomu transkryptu *opuCA* zaobserwowano w 3 szczepach (L28, L4 oraz L71) z wartością indukcji inwazyjności powyżej 100% i w 2 szczepach (L45 oraz L41) z wartością indukcji poniżej 100%, z kolei znaczący spadek transkryptu zanotowano w 1 szczepie (L56) z wartością indukcji poniżej 100% i w 2 szczepach (L84 oraz L1057) z wartością indukcji powyżej 100% (Ryc. 8).



Ryc. 8. Względna zmiana ekspresji genów *inlA*, *inlB* oraz *opuCA* w 10 szczepach *L. monocytogenes*, w tym 6 z wartością inwazyjności indukcji powyżej 100% i 4 z inwazyjnością indukcji poniżej 100%, poddanych działaniu 0.3 M NaCl. * - $p < 0.05$.

4.8. Określenie redukcji liczby bakterii w 10 szczepach *L. monocytogenes* ogrzewanych w temperaturze 54°C

Bakterie będące w fazie logarytmicznego wzrostu (OD_{600} 0.4-0.6) oraz w fazie stacjonarnej (OD_{600} 2.8-3.5) zostały ogrzane przez 20 oraz 60 minut w 54°C. Wykazano, że 20 minutowa inkubacja spowodowała redukcję liczby bakterii w zakresie od 0.6 do 1.7 rzędów w fazie logarytmicznego wzrostu oraz od 0.5 do 3 rzędów w fazie stacjonarnej. Efektem 60 minutowej ekspozycji był spadek liczby bakterii od 2.5 do 4 rzędów w fazie wzrostu logarytmicznego oraz 3.5 do 5 rzędów w fazie stacjonarnej (Ryc. 9).



Ryc. 9. Redukcja liczby bakterii w 10 szczepach *L. monocytogenes*: L84■, L45▲, L56●, L28◆, L71○, L83□, L41 △, L1057◇, L4×, L2061-, ogrzewanych przez 20 i 60 minut w 54 °C, w fazie wzrostu logarytmicznego - OD₆₀₀ 0.4-0.6 (A) oraz fazy stacjonarnej - OD₆₀₀ 2.8-3.5 (B). * - p < 0.05.

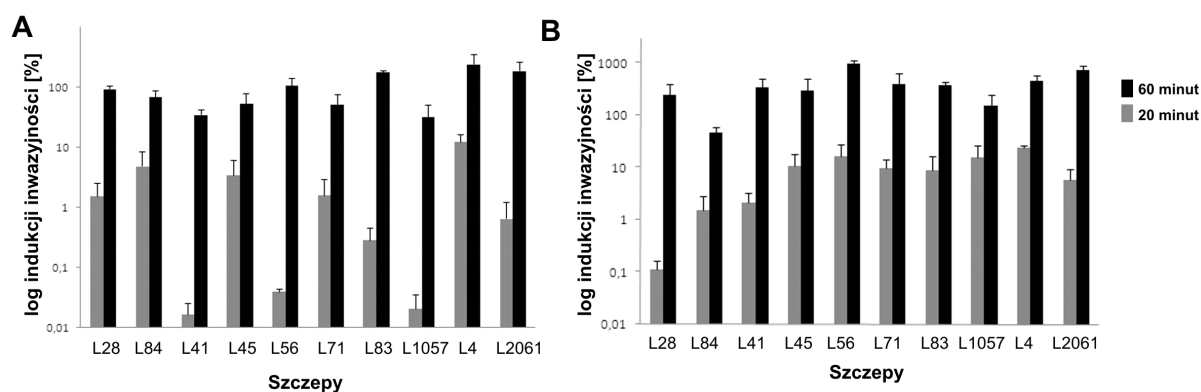
Porównując wartości redukcji liczby bakterii pomiędzy dwiema badanymi fazami wzrostu istotne różnice zaobserwowano w 1 szczepie (L84) po 20 minutach oraz w 3 szczepach (L28, L56, L4) po 60 minutach ogrzewania w 54°C. W obydwóch fazach wzrostu i czasach ekspozycji nie zaobserwowano istotnych różnic w redukcji liczby bakterii pomiędzy szczepami należącymi do różnych genotypów *actA* oraz szczepami o różnych źródłach pochodzenia (Tabela 5).

Tabela 5. Redukcja liczby bakterii w odpowiedzi na ogrzewanie w temperaturze 54°C z podziałem na genotypy *actA* oraz źródło pochodzenia szczepu.

Genotyp <i>actA</i>	Redukcja liczby bakterii [log]			
	ogrzewanie 20-minutowe		ogrzewanie 60-minutowe	
	Faza logarytmiczna	Faza stacjonarna	Faza logarytmiczna	Faza stacjonarna
I	1.14±0.61	1.6±0.87	3.06±0.4	4.15±0.28
II	1.04±0.54	2.0±0.59	3.35±0.54	4.41±0.27
III	1.25±0.47	2.27±0.98	2.75±0.37	4.38±0.59
Źródło szczepu				
ludzie	0.84± 0.18	1.48±.1.0	3.0±0.47	4.27±0.19
żywność	1.24±0.54	2.09±0.59	3.16±0.5	4.31±0.38

4.9. Określenie wpływu ogrzewania w temperaturze 54°C na inwazyjność 10 szczepów *L. monocytogenes*

Bakterie będące w fazie logarytmicznego wzrostu oraz w fazie stacjonarnej ogrzewano w temperaturze 54°C przez 20 i 60 minut i określano ich inwazyjność. Wykazano, iż 20 minutowe ogrzewanie wywołało istotny spadek inwazyjności wszystkich badanych szczepów. Wartości indukcji wynosiły od 0.0165 do 12.5 % (średnia 2.49 %) w fazie logarytmicznego wzrostu (Ryc. 10A) oraz od 1.5 do 24% (średnia 9.5%) w fazie stacjonarnej (Ryc. 10B). Ogrzewanie 60 minutowe nie zmieniało w sposób istotny inwazyjności badanych szczepów w fazie wzrostu logarytmicznego (zakres indukcji od 32 do 242 %, średnia 105 %), natomiast w istotny sposób zwiększało inwazyjność 5 szczepów (L4, L56, L71, L83, L2061) w fazie stacjonarnej (zakres indukcji od 47 do 985 %, średnia 403 %). Stwierdzono, że wydłużenie czasu ogrzewania w 54°C z 20 do 60 minut powoduje znaczący wzrost indukcji inwazyjności we wszystkich szczepach, niezależnie od fazy wzrostu (Ryc. 10).



Ryc. 10. Indukcja inwazyjności 10 szczepów *L. monocytogenes* ogrzewanych przez 20 i 60 minut w 54°C, reprezentujących fazę logarytmicznego wzrostu (A) oraz fazę stacjonarną (B). Szczepy hodowano w 37°C z wytrząsaniem przy 220 rpm do OD₆₀₀ 0.4-0.6 oraz do OD₆₀₀ 2.8-3.5, następnie ogrzewano w 54 °C przez 20 i 60 minut i określano inwazyjność w teście tworzenia łyseinek. Indukcję oznaczano jako iloraz inwazyjności bakterii poddanej działaniu czynnika stresowego oraz inwazyjności bakterii kontrolnych. Zmiany indukcji pomiędzy czasem 20 i 60 minut istotne we wszystkich szczepach ($p < 0.05$).

Porównując wartości indukcji pomiędzy fazą logarytmicznego wzrostu a fazą stacjonarną zaobserwowano istotny wzrost (3 do 800 krotny) w fazie stacjonarnej w 5 szczepach (L4, L45, L56, L83, L1057) po ogrzewaniu 20 minutowym oraz w 7 szczepach (L4, L41, L45, L56, L71, L83, L2061) po ogrzewaniu 60 minutowym (2 do 10 krotny

wzrost). Stwierdzono, że w fazie logarytmicznego wzrostu wszystkie szczepy niezależnie od genotypu *actA* istotnie różniły się inwazyjnością po 60 minutach ogrzewania. W fazie stacjonarnej, po takim samym czasie ogrzewania, istotne różnice inwazyjności stwierdzono pomiędzy szczepami pochodzącymi z różnych źródeł oraz szczepami należącymi do I i II oraz I i III genotypu *actA* (Tabela 6).

Tabela 6. Indukcja inwazyjności szczepów *L. monocytogenes* poddanych działaniu ogrzewania w temperaturze 54°C z podziałem na genotypy *actA* oraz źródło pochodzenia

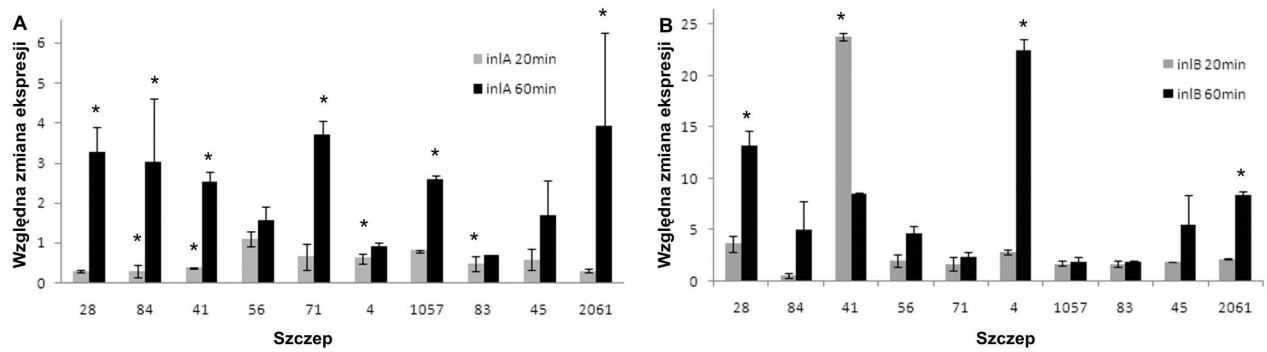
Genotyp <i>actA</i>	Indukcja inwazyjności [%]			
	ogrzewanie 20-minutowe		ogrzewanie 60-minutowe	
	Faza logarytmiczna	Faza stacjonarna	Faza logarytmiczna	Faza stacjonarna
I	2.81±2.85	3.59±5.59	61.89±28.35	214.61±173.84
II	0.49±0.88	13.03±8.79	93.33±60.97	487.63±362.73
III	7.4±6.99	14.73±10.22	211.71±88.13	594.17±202.03
Źródło				
ludzie	2.56±3.04	1.22±1.26	66.28±28.35	177.55±158.82
żywność	2.45±4.29	13.07±8.71	118.61±87.43	481.95±304.28

4.10. Określenie względnej ekspresji *inlA* oraz *inlB* w szczepach 10 *L. monocytogenes* ogrzewanych w temperaturze 54°C przez 20 i 60 minut

W 10 szczepach *L. monocytogenes* będących w fazie logarytmicznego wzrostu określono względną ekspresję *inlA* i *inlB*. W czterech szczepach (L4, L41, L83, L84), w których stwierdzono obniżenie inwazyjności w wyniku 20 minutowego ogrzewania w 54°C stwierdzono spadek względnego poziomu transkryptu *inlA*. W pozostałych szczepach nie stwierdzono istotnych zmian względnego poziomu transkryptu *inlA*. Po 60 minutach ogrzewania w 6 szczepach, w których nie obserwowano istotnych zmian inwazyjności (L28, L41, L71, L84, L1057, L2061) zanotowano wzrost ekspresji *inlA*. W pozostałych szczepach nie stwierdzono istotnych zmian względnego poziomu transkryptu *inlA*.

W jednym szczepie (L41), w którym stwierdzono obniżenie inwazyjności w wyniku 20 minutowego ogrzewania w 54°C stwierdzono wzrost względnego poziomu transkryptu *inlB*.

W pozostałych szczepach poziom ekspresji genu nie ulegał zmianie. Pomimo braku zmian inwazyjności w wyniku 60 minutowego ogrzewania zaobserwowano znaczący wzrost ekspresji *inlB* w 4 szczepach (L4, L28, L41, L2061). W pozostałych szczepach ekspresja *inlB* nie zmieniała się w istotny sposób (Ryc. 11).



Ryc. 11. Względna zmiana ekspresji genów *inlA* oraz *inlB* w 10 szczepach *L. monocytogenes* ogrzewanych w 54°C przez 20 i 60 minut. * - $p < 0.05$.

5. DYSKUSJA

L. monocytogenes zarówno podczas utrwalania żywności i jej przygotowania, jak i w trakcie kolonizacji przewodu pokarmowego narażona jest na szereg niekorzystnych czynników. Stres wywołuje w bakterii swoistą odpowiedź, która może zmieniać jej przeżywalność w odpowiedzi na kolejne dawki stresu. Dla patogenu stres stanowi sygnał do ekspresji nowego zestawu genów pomocnego w adaptacji do zmienionych warunków środowiska (Wesche *i wsp.*, 2009). Wydaje się obecnie, że nieodłącznym elementem odpowiedzi *L. monocytogenes* na stres środowiskowy są także zmiany ekspresji genów zaangażowanych w proces patogenezy. Dowiedziono, iż stres może zmieniać ekspresję genów internalin kodujących czynniki wirulencji związane z inwazją komórek eukariotycznych (Kazmierczak *i wsp.*, 2006). Wiadomo, że ekspresja internalin indukowana jest w odpowiedzi na stres osmotyczny oraz niskie pH (Sue *i wsp.*, 2004; Olesen *i wsp.*, 2009; Werbrouck *i wsp.*, 2009). Można zatem przypuszczać, że odpowiedź na stres może również zmieniać inwazyjność *L. monocytogenes*.

W niniejszej pracy analizowano wpływ stresu osmotycznego, wstrząsu cieplnego oraz gęstości hodowli na inwazyjność *L. monocytogenes*. Do tej pory niewiele wiadomo było na temat zmian inwazyjności patogenu w zależności od gęstości hodowli. Badania na linii CaCo-2 wykazały, iż inwazyjność bakterii w fazie stacjonarnej wzrasta w stosunku do inwazyjności w fazie logarytmicznego wzrostu (Kim *i wsp.*, 2005; Garner *i wsp.*, 2006). Z kolei, badania przeprowadzone na tym samym szczepie na linii HepG-2 wykazały spadek inwazyjności przy przejściu z fazy logarytmicznego wzrostu do fazy stacjonarnej (Kim *i wsp.*, 2005). Badania Bo Andersen *i wsp.* (2007) na innym szczepie *L. monocytogenes* oraz linii CaCo-2 także wykazały spadek inwazyjności w fazie stacjonarnej. Stwierdzono, iż na eksperymentalne określanie inwazyjności *L. monocytogenes* wpływ może mieć tempo proliferacji linii komórkowej użytej do doświadczeń. Wydaje się więc, że inwazyjność może być zróżnicowana w populacji *L. monocytogenes*, a wyniki jej oznaczania mogą zależeć od użytej linii komórkowej. Dlatego też do badań przeprowadzonych w niniejszej pracy wykorzystano linię ludzkiego raka okrężnicy HT-29, która w porównaniu do stosowanej przez wielu autorów linii raka okrężnicy CaCo-2 wykazuje stałe tempo proliferacji i wydaje się być najlepszym modelem do określania zdolności *L. monocytogenes* do wnikania do epitelium (Velge *i wsp.*, 1997). Badania porównawcze dowodzą, że zastosowany w badaniach test

tworzenia łąsinek najlepiej odzwierciedla wirulencję *L. monocytogenes* w porównaniu z wynikami testów *in vivo* (Roche *i wsp.*, 2001).

Ponieważ dotychczasowe badania inwazyjności *L. monocytogenes* przeprowadzone zostały na maksymalnie trzech szczepach, najczęściej zaadaptowanych do warunków laboratoryjnych, w niniejszej pracy zbadano inwazyjność 10 szczepów *L. monocytogenes*, izolowanych z żywności lub od ludzi i reprezentujących wszystkie główne genotypy *actA*. Wykazano, iż wraz ze wzrostem gęstości hodowli maleje inwazyjność wszystkich badanych szczepów. Obserwowana redukcja inwazyjności pomiędzy fazą logarytmiczną, a zaawansowanym stadium fazy stacjonarnej różni się od 10 do 400 razy pomiędzy szczepami *L. monocytogenes*. Redukcja ta jest istotnie wyższa w szczepach izolowanych z żywności w porównaniu ze szczepami klinicznymi, ale nie zależy od genotypu *actA*. Stwierdzono też, że wraz ze zmianą gęstości hodowli następuje zmiana pH pożywki osiągając, po 18 godzinnej hodowli, wartość 4.5. W celu stwierdzenia czy obserwowane zmiany inwazyjności w funkcji gęstości nie wiążą się jedynie ze spadkiem odczynu podłoża bakterie hodowano w stabilizowanym za pomocą buforu podłożu o pH 7. Stwierdzono, że w tych warunkach nie dochodzi do zmian pH, nawet po 18 godzinach hodowli. Wykazano, iż stabilizacja pH nie zmieniała w istotny sposób wartości inwazyjności w stosunku do wartości wyznaczonych w pożywce, w której dochodziło do spadku pH. Potwierdzono w ten sposób, że spadek inwazyjności bakterii w fazie stacjonarnej związany jest ze zmianą gęstości optycznej hodowli.

Zwiększone ciśnienie osmotyczne jest czynnikiem często spotykanym przez *L. monocytogenes* w środowisku. Solenie jest jedną z najpowszechniejszych metod konserwacji żywności. Warunki zwiększonego ciśnienia osmotycznego bakteria napotyka także w dwunastnicy, gdzie stężenie chlorku sodu może osiągać wartość 0.3M (Chowduhry *i wsp.*, 1996). Wykazano, że 10 minutowa ekspozycja *L. monocytogenes* na działanie 0.3M NaCl indukuje ekspresję genów zależnych od sigma B (Kazmierczak *i wsp.*, 2006). Wyniki niniejszej pracy dowodzą, iż ekspozycja na stres osmotyczny wpływa w zróżnicowany sposób na inwazyjność 10 szczepów *L. monocytogenes*. Z kolei, wydłużenie czasu działania czynnika stresowego do 1 godziny oraz zwiększenie jego stężenia do 1.8M nie powoduje istotnych zmian inwazyjności w większości szczepów. Wykazano zatem, iż krótki czas ekspozycji oraz niskie stężenie NaCl są wystarczające aby zaobserwować maksymalne zmiany inwazyjności *L. monocytogenes* w odpowiedzi na stres osmotyczny. Dlatego do dalszych badań efektu

stresu osmotycznego na inwazyjność populacji *L. monocytogenes* wybrano 0.3 M stężenie NaCl i czas ekspozycji 10 minut.

Niewiele wiadomo na temat zmian inwazyjności w odpowiedzi na stres osmotyczny w różnych fazach wzrostu. Do tej pory efekt ciśnienia osmotycznego na inwazyjność *L. monocytogenes* rozpatrywano niezależnie w fazie stacjonarnej oraz w fazie wzrostu logarytmicznego. Badania Olesen i wsp. (2009) wykazały, iż w fazie logarytmicznego wzrostu, inwazyjność bakterii zaadaptowanych do środowiska o zwiększonym ciśnieniu osmotycznym rośnie. Podobnie zmienia się inwazyjność bakterii w stacjonarnej fazie wzrostu poddanych działaniu stresu osmotycznego (Garner i wsp., 2006). W naturalnym środowisku bakterie występują najczęściej w stacjonarnej fazie wzrostu (Kolter i wsp., 1993). Wzrost bakterii ograniczany jest wówczas dostępnością składników odżywczych, co jest czynnikiem wywołującym odpowiedź na stres. Wejście w stacjonarną fazę wzrostu wywołuje w bakterii szereg zmian fizjologicznych, co może prowadzić do wzrostu oporności bakterii na kolejne dawki niekorzystnych czynników (Rees i wsp., 1995). Przeprowadzone badania wpływu stresu osmotycznego na inwazyjność *L. monocytogenes* w zależności od gęstości hodowli wykazały brak istotnych różnic w indukcji inwazyjności pomiędzy różnymi stadiami fazy logarytmicznego wzrostu (OD_{600} 0.4-1.2). Znaczące różnice stwierdzono natomiast we wczesnym stadium fazy logarytmicznego wzrostu (OD_{600} 0.2-0.3) oraz w zaawansowanym stadium stacjonarnej fazy wzrostu, po 18 godzinach hodowli (OD_{600} 2.8-3.5). Nie zanotowano związku między zmianami inwazyjności a źródłem pochodzenia szczepów w żadnej z faz wzrostu. Istotnie wyższą indukcję inwazyjności zaobserwowano jedynie między szczepami należącymi do II i III genotypu *actA* w fazie stacjonarnej. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że wzrost gęstości kolonii bakteryjnej związany z przejściem do fazy stacjonarnej wzrostu wywołuje istotny spadek inwazyjności szczepów *L. monocytogenes*. Niemniej jednak, indukcja inwazyjności bakterii w odpowiedzi na stres osmotyczny jest silniejsza w fazie stacjonarnej niż w fazie logarytmicznego wzrostu.

Ponieważ internaliny odpowiedzialne są za inwazję komórek eukariotycznych, a czynnik OpuCA zaangażowany jest w odpowiedź na stres osmotyczny wydaje się, że ekspresja ich genów powinna korelować z inwazyjnością oraz uruchomieniem odpowiedzi na stres *L. monocytogenes*. Badania Olesen i wsp. (2009) wykazały, że ekspresja tych genów nie zawsze koreluje z inwazyjnością bakterii. Wyniki otrzymane w niniejszej pracy także wskazują na brak korelacji między poziomem tych transkryptów a inwazyjnością w odpowiedzi na stres osmotyczny w większości szczepów. Brak korelacji może wskazywać na

udział dodatkowych czynników, które decydują o inwazyjności *L. monocytogenes*. Należy podkreślić, że wszystkie dotychczasowe badania przeprowadzone były na bakteriach hodowanych wyłącznie w podłożach mikrobiologicznych. Możliwe jest, iż poziom ekspresji tych genów zmienia się w kontakcie z receptorami zlokalizowanymi na powierzchni komórek eukariotycznych. Zatem rzeczywista ekspresja może różnić się od ekspresji wyznaczanej dla bakterii rosnących w podłożach mikrobiologicznych.

Wyniki badań nad wpływem stresu osmotycznego na inwazyjność *L. monocytogenes* dowodzą, iż krótki czas działania chlorku sodu oraz jego niskie stężenie są wystarczające by wywołać maksymalną inwazyjność w odpowiedzi na stres. Odpowiedź ta jest jednak znacznie zróżnicowana w populacji *L. monocytogenes* i zależy w dużym stopniu od fazy wzrostu bakterii, dlatego trudno będzie stworzyć jednolity sposób przewidywania zachowania poszczególnych szczepów w warunkach stresu (Wałęcka *i wsp.*, 2011a).

Obróbka cieplna stanowi jeden z najefektywniejszych sposobów redukcji liczby *L. monocytogenes* i stosowana jest ona zarówno w trakcie utrwalania żywności jak i jej przygotowywania do spożycia (Zhang *i wsp.* 2010b). Znaczącą redukcję liczby tej bakterii można zaobserwować już w temperaturach powyżej 50°C (Doyle *i wsp.* 2001). Z temperaturami w zakresie od 47 do 61°C *L. monocytogenes* może spotykać się wewnątrz żywności niedogotowanej oraz w produktach o przedłużonym okresie trwałości w trakcie ich rozmrażania w kuchenkach mikrofalowych (Skandamis *i wsp.* 2008). Dlatego w opisywanych tu badaniach zastosowano temperaturę 54°C, która pozwoliła na znaczącą redukcję liczby bakterii, jednocześnie umożliwiając określenie zmian inwazyjności patogenu w odpowiedzi na zadany stres. Efekt wstrząsu cieplnego na redukcję liczby bakterii oraz inwazyjność *L. monocytogenes* zbadano w dwóch odstępach czasu oraz w dwóch fazach wzrostu bakterii. Wykazano, iż przeżywalność bakterii w temperaturze 54°C zależy od czasu ogrzewania. Maksymalną redukcję liczby bakterii, o 5 rzędów wielkości, osiągnano po 60 minutach ogrzewania dla bakterii w fazie stacjonarnej wzrostu. W większości szczepów nie zaobserwowano istotnych różnic w redukcji liczby bakterii pomiędzy fazą logarytmicznego wzrostu oraz fazą stacjonarną. Nie potwierdziło to wcześniejszych badań Jørgensen *i wsp.* (1999) oraz McMahon *i wsp.* (2000), którzy wykazali, że bakterie w fazie stacjonarnej lepiej przeżywają w warunkach wstrząsu cieplnego. Brak zgodności z tymi badaniami może wynikać z zastosowania innego medium, odmiennych warunków wzrostu oraz zróżnicowanej wrażliwości poszczególnych szczepów, które decydują razem o ciepłooporności bakterii

(Doyle *i wsp.* . 2001; Lin i Chou, 2004). Otrzymane wyniki wykazały także brak korelacji między źródłem pochodzenia szczepu oraz genotypem a przeżywalnością.

Efekt wstrząsu cieplnego na inwazyjność *L. monocytogenes* nie był dotąd badany. W niniejszej pracy wykazano, że krótki czas ekspozycji (20 minut) w 54°C wywołuje znaczący spadek inwazyjności we wszystkich badanych szczepach, bez względu na fazę wzrostu. Redukcja inwazyjności była silnie zaznaczona w fazie logarytmicznego wzrostu i wynosiła od 10 do 6000 razy, podczas gdy spadek inwazyjności bakterii z fazy stacjonarnej wzrostu kształtował się na poziomie 4 do 70 razy. Wydłużenie czasu ogrzewania do 60 minut wywołało 10 - 2700 krotny wzrost indukcji inwazyjności bakterii w stosunku do 20 minutowej ekspozycji w 54°C, niezależnie od fazy wzrostu. Sześćdziesięciminutowe ogrzewanie nie zmieniło jednak w sposób istotny inwazyjności szczepów znajdujących się w fazie logarytmicznego wzrostu, w odniesieniu do inwazyjności szczepów nie poddanych działaniu czynnika stresowego. Wzrost inwazyjności w odpowiedzi na 60 minutowy wstrząs cieplny zanotowano w 5 szczepach w fazie stacjonarnej, gdzie maksymalna indukcja inwazyjności wynosiła 1000%, była zatem 10 krotnie wyższa od inwazyjności szczepu nie ogrzewanego. Dla większości szczepów inwazyjność w odpowiedzi na 20 i 60 minutowe ogrzewanie była istotnie wyższa w fazie stacjonarnej wzrostu aniżeli w fazie wzrostu logarytmicznego. Stres związany z zagęszczeniem populacji podobnie jak w przypadku stresu osmotycznego spowodował wzrost inwazyjności bakterii w odpowiedzi na kolejny czynnik stresowy. Najwyższą inwazyjność w odpowiedzi na ogrzewanie zanotowano w fazie stacjonarnej w szczepach pochodzących z żywności i należących do III genotypu *actA*. Badania nad ekspresją internalin w reakcji na ekspozycję w 54°C wykazały podobnie jak w przypadku stresu osmotycznego brak korelacji z inwazyjnością *L. monocytogenes*.

Na podstawie otrzymanych wyników można wnioskować, iż czas działania stresu cieplnego decyduje nie tylko o redukcji liczby bakterii, ale także o inwazyjności patogenu w odpowiedzi na stres. Krótki czas ogrzewania skutkuje mniejszą redukcją liczby bakterii, ale za to skutecznie obniża inwazyjność wszystkich szczepów *L. monocytogenes*. Z kolei, wydłużenie czasu ogrzewania pozwala osiągnąć wyższą redukcję liczby bakterii, jednak wiąże się to ze wzrostem ich inwazyjności. Gwałtowny spadek inwazyjności a następnie jej wzrost może wynikać z adaptacji bakterii do bodźca termicznego o stałym natężeniu, która w tym wypadku następuje dopiero po czasie przekraczającym 20 minut. Można przypuszczać, że gdyby stopniowo zwiększać temperaturę ogrzewania, bądź stosować wyższą temperaturę i krótszy czas ogrzewania, tak aby bakterie nie zdążyły zaadaptować się do zmieniających się

warunków otoczenia, można by jednocześnie uzyskać skuteczną redukcję liczby bakterii i inwazyjności (Wałęcka *i wsp.*, 2011b).

Podsumowując badania będące przedmiotem niniejszej rozprawy można stwierdzić, iż stres związany z ograniczeniem dostępności składników odżywczych, wywołany zagęszczeniem populacji bakteryjnej, powoduje znaczący spadek inwazyjności szczepów *L. monocytogenes*. Inwazyjność *L. monocytogenes* zwiększa się jednak w znaczący sposób w odpowiedzi na kolejny czynnik stresowy, jakim w zastosowanym modelu doświadczalnym był stres osmotyczny oraz wstrząs cieplny. Spadek odczynu środowiska, wynikający ze wzrostu gęstości optycznej hodowli bakteryjnej nie zmienia inwazyjności bakterii. Wzrost stężenia NaCl oraz czasu jego działania nie powoduje znaczących zmian inwazyjności większości szczepów bakteryjnych. Czynnik czasu odgrywa jednak decydującą rolę w przypadku działania stresu cieplnego. Obserwowane zmiany inwazyjności nie zawsze korelują z ekspresją czynników wirulencji warunkujących wnikanie do komórek gospodarza. Porównując efekt działania stresu osmotycznego, wstrząsu cieplnego oraz stresu związanego ze wzrostem gęstości optycznej kolonii bakteryjnej wykazano, iż inwazyjność szczepów najsilniej zmienia się w odpowiedzi na czynniki stresowe ograniczające liczebność bakterii, a więc ogrzewanie oraz zagęszczenie populacji. Odpowiedź ta jest jednak zróżnicowana w populacji *L. monocytogenes* i trudno będzie stworzyć jednolity sposób przewidywania zachowania określonych szczepów w warunkach stresu.

Z uwagi na to, że *L. monocytogenes* jest jedną z niewielu bakterii doskonale przystosowanych do życia i rozmnażania się w cytoplazmie komórek eukariotycznych stanowi ona obecnie model w badaniach efektu stresu na przeżywalność, a przede wszystkim wirulencję patogenów wewnątrzkomórkowych. Badania nad efektem czynników stresowych na patogenność *L. monocytogenes* mogą być pomocne w projektowaniu nowoczesnych metod utrwalania żywności, wykazujących wysoką skuteczność w redukcji liczby patogennych mikroorganizmów nie wzbudzając jednocześnie odpowiedzi na stres.

WNIOSKI

1. Inwazyjność *L. monocytogenes* zmienia się najsilniej w odpowiedzi na ogrzewanie oraz stres związany z zagęszczeniem populacji. Wielkość zmian inwazyjności jest zróżnicowana w populacji *L. monocytogenes*.
2. Wzrost zagęszczenia populacji wywołuje spadek inwazyjności *L. monocytogenes*.
3. Ogrzewanie oraz wzrost ciśnienia osmotycznego zwiększa inwazyjność *L. monocytogenes* w stacjonarnej fazie wzrostu.
4. Niskie stężenia chlorku sodu oraz krótkie czasy jego działania są wystarczające do wywołania maksymalnych zmian inwazyjności *L. monocytogenes*.
5. Czas działania podwyższonej temperatury w istotny sposób wpływa na inwazyjność *L. monocytogenes*. Krótkie ogrzewanie obniża, zaś dłuższe zwiększa inwazyjność *L. monocytogenes*.
6. Zmiana poziomu mRNA internalin *inlA* oraz *inlB* w odpowiedzi na stres osmotyczny oraz termiczny w wielu szczepach *L. monocytogenes* nie jest powiązana z ich inwazyjnością.

PIŚMIENICTWO

1. Angelidis, A.S., Smith, L.T., Hoffman, L.M., Smith, G.M. (2002). Identification of *opuC* as a chill-activated and osmotically activated carnitine transporter in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2644-2650.
2. Angelidis, A.S., Smith, G.M. (2003a). Role of the glycine betaine and carnitine transporters in adaptation of *Listeria monocytogenes* to chill stress in defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7492-7498.
3. Angelidis, A.S., Smith, G.M. (2003b). Three transporters mediate uptake of glycine betaine and carnitine by *Listeria monocytogenes* in response to hyperosmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1013-1022.
4. Bajard, S., Rosso, L., Fardel, G., and Flandrois, J. P. (1996). The particular behaviour of *Listeria monocytogenes* under sub-optimal conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 201–211.
5. Becker, L.A., Cetin, M.S., Hutkins, R.W., Benson, A.K. (1998). Identification of the gene encoding the alternative sigma factor sigmaB from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. *J. Bacteriol.* 180, 4547-4554.
6. Becker, L.A., Evans, S.N., Hutkins, R.W., and Benson, A.K. (2000). Role of sigma(B) in adaptation of *Listeria monocytogenes* to growth at low temperature. *J. Bacteriol.* 182, 7083-7087.
7. Begley, M., Gahan, C.G., Hill, C. (2002). Bile stress response in *Listeria monocytogenes* LO28: adaptation, cross-protection, and identification of genetic loci involved in bile resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 6005-6012.
8. Beumer, R.R., Te Giffel, M.C., Cox, L.J., Rombouts, F.M., Abee, T. (1994). Effect of exogenous proline, betaine, and carnitine on growth of *Listeria monocytogenes* in a minimal medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1359-1363.
9. Bierne, H., Sabet, C., Personnic, N., Cossart, P. (2007). Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. *Microbes Infect.* 9, 1156-1166.
10. Bo Andersen, J., Roldgaard, B.B., Christensen, B.B., Licht, T.R. (2007). Oxygen restriction increases the infective potential of *Listeria monocytogenes* in vitro in Caco-2 cells and in vivo in guinea pigs. *BMC Microbiology* 7, 55.

11. Boor, K.J. (2006). Bacterial stress responses: what doesn't kill them can make them stronger. *PLoS Biol* 4, e23.
12. Cameron, L.A., Giardini, P.A., Soo, F.S., Theriot, J.A. (2000). Secrets of actin-based motility revealed by a bacterial pathogen. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 110-119.
13. Camilli A., Tilney L.G., Portnoy D.A. (1993). Dual roles of *plcA* in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 8, 143-157.
14. Cetin, M.S., Zhang, C., Hutkins, R.W., Benson, A.K. (2004). Regulation of transcription of compatible solute transporters by the general stress sigma factor, sigmaB, in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol.* 186, 794-802.
15. Chastanet, A., Derre, I., Nair, S., Msadek, T. (2004). *clpB*, a novel member of the *Listeria monocytogenes* CtsR regulon, is involved in virulence but not in general stress tolerance. *J. Bacteriol.* 186, 1165-1174.
16. Chatterjee, S.S., Otten, S., Hain, T., Lingnau, A., Carl, U.D., Wehland, J., Domann, E., Chakraborty, T. (2005). Invasiveness is a variable and heterogeneous phenotype in *Listeria monocytogenes* serotype strains. *Int. J. Med. Microbiol.* 296, 277-286.
17. Chaturongakul, S., Boor, K.J. (2004). RsbT and RsbV contribute to sigmaB-dependent survival under environmental, energy, and intracellular stress conditions in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5349-5356.
18. Chowdhury, R., Sahu, G.K., Das, J. (1996). Stress response in pathogenic bacteria. *J. Biosci.* 21, 149-160.
19. Cossart, P., Toledo-Arana, A. (2008). *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes Infect.* 10, 1041-1050.
20. Cotter, P.D., Emerson, N., Gahan, C.G., Hill, C. (1999). Identification and disruption of *lisRK*, a genetic locus encoding a two-component signal transduction system involved in stress tolerance and virulence in *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 181, 6840-6843.
21. Cotter, P.D., Guinane, C.M., Hill, C. (2002). The *LisRK* signal transduction system determines the sensitivity of *Listeria monocytogenes* to nisin and cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2784-2790.
22. Craig E.A., Gambill B.D., Nelson R.J. (1993). Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.* 57, 402-414.
23. Csonka, L.N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* 53, 121-147.

24. Czuprynski C.J., Haak-Frendscho M. (1997). Non-specific resistance mechanisms to listeriosis: implications for experimental and naturally occurring infection. *Infect Immun.* 64, 3946-3949.
25. de las Heras, A., Cain, R.J., Bielecka, M.K., Vázquez-Boland, J.A. 2011. Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Cur. Opin. Microbiol.* 14, 118-127.
26. Decatur, A.L., Portnoy, D.A. (2000). A PEST-like sequence in listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity. *Science.* 290, 992-995.
27. Derré, I., Rapoport, G., Msadek, T. (2000). The CtsR regulator of stress response is active as a dimer and specifically degraded in vivo at 37 degrees C. *Mol. Microbiol.* 38, 335-347.
28. Doyle, M.E., Mazzotta, A.S., Wang, T., Wiseman, D.W., Scott, V.N. (2001). Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 64, 410-429.
29. Drevets, D.A., Bronze, M.S. (2008). *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 53, 151-165.
30. Duché, O., Trémoulet, F., Glaser, P., Labadie, J. (2002). Salt stress proteins induced in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1491-1498.
31. Dussurget O., Cabanes D., Dehoux P., Lecuit M., Buchrieser C., Glaser P., Cossart P.; European *Listeria* Genome Consortium. (2002). *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Mol. Microbio.* 145, 1095-1106.
32. Earnshaw, R.G., Appleyard, J., Hurst, R.M. (1995). Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 197-219.
33. Engelbrecht, F., Chun, S.K., Ochs, C., Hess, J., Lottspeich, F., Goebel, W., Sokolovic, Z. (1996). A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Mol. Microbiol.* 21, 823-837.
34. Farber, J.M., Peterkin, P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55, 476-511.
35. Fayet, O., Ziegelhoffer, T., Georgopoulos, C. (1989). The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J. Bacteriol.* 171, 1379-1385.

36. Ferreira, A., Gray, M., Wiedmann, M., Boor, K.J. (2004). Comparative genomic analysis of the sigB operon in *Listeria monocytogenes* and in other Gram-positive bacteria. *Curr. Microbiol.* 48, 39-46.
37. Ferreira, A., O'Byrne, C.P., Boor, K.J. (2001). Role of sigma(B) in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4454-4457.
38. Fraser, K.R., Harvie, D., Coote, P.J., O'Byrne, C.P. (2000). Identification and characterization of an ATP binding cassette L-carnitine transporter in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4696-4704.
39. Fraser, K.R., Sue, D., Wiedmann, M., Boor, K., O'Byrne, C.P. (2003). Role of sigmaB in regulating the compatible solute uptake systems of *Listeria monocytogenes*: osmotic induction of opuC is sigmaB dependent. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2015-2022.
40. Freitag, N.E., Rong, L., Portnoy, D.A. (1993). Regulation of the prfA transcriptional activator of *Listeria monocytogenes*: multiple promoter elements contribute to intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* 61, 2537-2544.
41. Fretz, R., Pichler, J., Sagel, U., Much, P., Ruppitsch, W., Pietzka, A.T., Stöger, A., Huhulescu, S., Heuberger, S., Appl, G., Werber, D., Stark, K., Prager, R., Flieger, A., Karpísková, R., Pfaff, G., Allerberger, F. (2010). Update: Multinational listeriosis outbreak due to 'Quargel', a sour milk curd cheese, caused by two different *L. monocytogenes* serotype 1/2a strains, 2009-2010. *Euro. Surveill.* 15, pii: 19543.
42. Gahan, C.G., Hill, C. (1999). The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 93-100.
43. Gahan, C.G., O'Mahony, J., Hill, C. (2001). Characterization of the groESL operon in *Listeria monocytogenes*: utilization of two reporter systems (gfp and hly) for evaluating in vivo expression. *Infect. Immun.* 69, 3924-3932.
44. Gailllot, O., Pellegrini, E., Bregenholt, S., Nair, S., Berche, P. (2000). The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 35, 1286-1294
45. Gailllot, O., Bregenholt, S., Jaubert, F., Di Santo, J.P., Berche, P. (2001). Stress-induced ClpP serine protease of *Listeria monocytogenes* is essential for induction of listeriolysin O-dependent protective immunity. *Infect. Immun.* 69, 4938-4943.

46. Garner, M.R., James, K.E., Callahan, M.C., Wiedmann, M., Boor, K.J. (2006). Exposure to salt and organic acids increases the ability of *Listeria monocytogenes* to invade Caco-2 cells but decreases its ability to survive gastric stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5384-5395.
47. Gerhardt, P.N., Smith, L.T., Smith, G.M. (1996). Sodium-driven, osmotically activated glycine betaine transport in *Listeria monocytogenes* membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 178, 6105-6109.
48. Gerhardt, P.N., Tombras Smith, L., Smith, G.M. (2000). Osmotic and chill activation of glycine betaine porter II in *Listeria monocytogenes* membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 182, 2544-2550.
49. Gottesman, S., Wickner, S., Maurizi, M.R. (1997). Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes Dev.* 11, 815-823.
50. Hanawa, T., Kai, M., Kamiya, S., Yamamoto, T. (2000). Cloning, sequencing, and transcriptional analysis of the dnaK heat shock operon of *Listeria monocytogenes*. *Cell Stress Chaperones.* 5, 21-29.
51. Hanawa, T., Yamanishi, S., Murayama, S., Yamamoto, T., Kamiya, S. (2002). Participation of DnaK in expression of genes involved in virulence of *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 214, 69-75.
52. Hecker, M., Schumann, W., Völker, U. (1996). Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 19, 417-428.
53. Jørgensen F, Hansen TB, Knøchel S. Heat shock-induced thermotolerance in *Listeria monocytogenes* 13-249 is dependent on growth phase, pH and lactic acid. *Food Microbiol.* 1999, 16:185-194.
54. Kallipolitis, B.H., Ingmer, H. (2001). *Listeria monocytogenes* response regulators important for stress tolerance and pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 204, 111-115.
55. Karatzas, K.A., Bennik, M.H. (2002). Characterization of a *Listeria monocytogenes* Scott A isolate with high tolerance towards high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3183–3189.
56. Karatzas, K.A, Wouters, J.A, Gahan, C.G, Hill, C., Abee, T., Bennik. M.H. (2003). The CtsR regulator of *Listeria monocytogenes* contains a variant glycine repeat region that affects piezotolerance, stress resistance, motility and virulence. *Mol. Microbiol.* 49, 1227-1238.

57. Kazmierczak, M.J., Mithoe, S.C., Boor, K.J., Wiedmann M. (2003). *Listeria monocytogenes* sigma B regulates stress response and virulence functions. J. Bacteriol. 185, 5722-5734.
58. Kazmierczak, M.J., Wiedmann, M., Boor, K.J. (2005). Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence J. Bacteriol. 185, 5722-5734.
59. Kazmierczak, M.J., Wiedmann, M., Boor, K.J. (2006). Contributions of *Listeria monocytogenes* sigmaB and PrfA to expression of virulence and stress response genes during extra- and intracellular growth. Microbiology. 152, 1827-1838.
60. Kilstrop, M., Jacobsen, S., Hammer, K., Vogensen, F.K. (1997). Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 63, 1826-1837.
61. Kim, H., Boor, K.J., Marquis, H. (2004). *Listeria monocytogenes* sigmaB contributes to invasion of human intestinal epithelial cells. Infect. Immun. 72, 7374-7378.
62. Kim, H., Marquis, H, Boor, K.J. (2005). SigmaB contributes to *Listeria monocytogenes* invasion by controlling expression of inlA and inlB. Microbiology. 151, 3215-3222.
63. Kirstein, J., Zühlke, D., Gerth, U., Turgay, K., Hecker, M. (2005). A tyrosine kinase and its activator control the activity of the CtsR heat shock repressor in *B. subtilis*. EMBO J. 24, 3435-3445.
64. Ko, R., Smith, L.T., Smith, G.M. (1994). Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol. 176, 426-431.
65. Ko, R., Smith, L.T. (1999). Identification of an ATP-driven, osmoregulated glycine betaine transport system in *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 65, 4040-4048.
66. Kolter, R.D., Siegele, A., Tormo, A., 1993. The stationary phase of the bacterial life cycle. Ann. Rev. Microbiol. 47, 855-874.
67. Krojer, T., Garrido-Franco, M., Huber. R., Ehrmann, M., Clausen T. (2002). Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. Nature. 416:455-459.
68. Krüger, E., Zühlke, D., Witt, E., Ludwig, H., Hecker, M. (2001). Clp-mediated proteolysis in Gram-positive bacteria is autoregulated by the stability of a repressor. EMBO J. 20, 852-863.

69. Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M.K., Hartl, F.U. (1992). Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature*. 356, 683-689.
70. Lasa, I., David, V., Gouin, E., Marchand, J.B., Cossart, P. (1995). The amino-terminal part of ActA is critical for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*; the central proline-rich region acts as a stimulator. *Mol. Microbiol.* 18, 425-436.
71. Lecuit, M., Ohayon, H., Braun, L., Mengaud, J., and Cossart, P. (1997). Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect. Immun.* 65, 5309-5319.
72. Lecuit, M., Hurme, R., Pizarro-Cerda, J., Ohayon, H., Geiger, B., Cossart, P. (2000). A role for alpha-and beta-catenins in bacterial uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci .U S A.* 18, 10008-10013.
73. Lin Y., Chou Ch. (2004). Effect of heat shock on thermal tolerance and susceptibility of *Listeria monocytogenes* to other environmental stresses. *Food Microbiol.* 21, 605-610.
74. Lingnau, A., Domann, E., Hudel, M., Bock, M., Nichterlein, T., Wehland, J., Chakraborty, T. (1995). Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inlA and inlB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infect. Immun.* 63, 3896-3903.
75. Low, J.C., Donachie W. (1997). A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet. J.* 153, 9-29.
76. Lundén, J., Tolvanen, R., Korkeala, H. (2008). Acid and heat tolerance of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* food plant strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 276-80.
77. Lungu, B., Ricke, S.C., Johnson, M.G. (2008). Resistance of nutrient-deprived *Listeria monocytogenes* 10403S and a DeltasigB mutant to chemical stresses in the presence or absence of oxygen. *J. Food Sci.* 73, M339-345.
78. Lungu, B., Ricke, S.C., Johnson, M.G. (2009). Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: a review. *Anaerobe.* 1, 7-17.
79. Marles-Wright, J., Lewis, R.J. (2007). Stress responses of bacteria *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17, 755-760.

80. Maurizi, M.R, Clark, W.P., Kim S.H., Gottesman S. (1990). Clp P represents a unique family of serine proteases. *J. Biol. Chem.* 265, 12546-12552.
81. McClure, P.J., Roberts, T.A., Oguru, P.O. (1989). Comparison of the effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and in liquid medium. *Lett. Appl. Microbiol.* 9, 95-99.
82. McGann, P., Wiedmann, M., Boor, K.J. (2007). The alternative sigma factor sigma B and the virulence gene regulator PrfA both regulate transcription of *Listeria monocytogenes* internalins. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2919-2930.
83. McMahan C.M., Byrne C.M., Sheridan J.J., McDowell D.A., Blair I.S., Hegarty T. (2000). The effect of culture growth phase on induction of the heat shock response in *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* 89, 198-206.
84. Mendum, M.L., Smith, L.T. (2002a). Characterization of glycine betaine porter I from *Listeria monocytogenes* and its roles in salt and chill tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 813-819.
85. Mendum, M.L., Smith, L.T. (2002b). Gbu glycine betaine porter and carnitine uptake in osmotically stressed *Listeria monocytogenes* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5647-5655.
86. Mogk A., Homuth G., Scholz C., Kim L., Schmid F.X., Schumann W. (1997). The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* 16, 4579-4590.
87. Muga, A., Moro, F. (2008). Thermal adaptation of heat shock proteins. *Curr. Protein. Pept. Sci.* 9, 552-566.
88. Nair ,S., Frehe,l C., Nguyen, L., Escuyer, V., Berche, P. (1999). ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 31, 185-196.
89. Nair, S., Milohanic, E., Berche, P. (2000). ClpC ATPase is required for cell adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 68, 7061-7068.
90. Nightingale, K.K., Ivy, R.A., Ho, A.J., Fortes, E.D., Njaa, B.L., Peters, R.M., Wiedmann, M. (2008). inlA premature stop codons are common among *Listeria monocytogenes* isolates from foods and yield virulence-attenuated strains that confer protection against fully virulent strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6570-6583.
91. Nightingale, K.K., Windham, K., Martin, K.E., Yeung, M., Wiedmann, M. (2005). Select *Listeria monocytogenes* subtypes commonly found in foods carry distinct

- nonsense mutations in *inlA*, leading to expression of truncated and secreted internalin A, and are associated with a reduced invasion phenotype for human intestinal epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8764-8772.
92. Okada, Y., Makino, S., Tobe, T., Okada, N., Yamazaki, S. (2002). Cloning of *rel* from *Listeria monocytogenes* as an osmotolerance involvement gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1541-1547.
 93. Olesen, I., Vogensen, F.K., Jespersen, L. (2009). Gene transcription and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains after exposure to acidic and NaCl stress. *Foodborne Pathog. Dis.* 6, 669-680.
 94. Paget, M.S., Helmann, J.D. (2003). The sigma70 family of sigma factors. *Genome Biol.* 4:203.
 95. Pallen, M.J., Wren, B.W. (1997). The HtrA family of serine proteases. *Mol. Microbiol.* 26, 209-221.
 96. Parkinson, J.S. (1993). Signal transduction schemes of bacteria. *Cell.* 73, 857-71.
 97. Patchett, R.A., Kelly, A.F., Kroll, R.G. (1992). Effect of sodium chloride on the intracellular solute pools of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3959-3963.
 98. Poquet, I., Saint, V., Seznec, E., Simoes, N., Bolotin, A., Gruss, A. (2000). HtrA is the unique surface housekeeping protease in *Lactococcus lactis* and is required for natural protein processing. *Mol. Microbiol.* 35, 1042-1051.
 99. Porankiewicz, J., Wang, J., Clarke, A.K. (1999). New insights into the ATP-dependent Clp protease: *Escherichia coli* and beyond. *Mol. Microbiol.* 32, 449-458.
 100. Portnoy, D.A., Auerbuch, V., Glomski, I.J. (2002). The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *J. Cell Biol.* 158, 409-414.
 101. Poyart, C., Abachin, E., Razafimanantsoa, I., Berche, P. (1993). The zinc metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is required for maturation of phosphatidylcholine phospholipase C: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect. Immun.* 61, 1576-1580.
 102. Ragon, M., Wirth, T., Hollandt, F., Lavenir, R., Lecuit, M., Le Monnier, A., Brisse, S. (2008). A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathog.* 4, e1000146.

103. Rees, C.E., Dodd, C.E., Gibson, P.T., Booth, I.R., Stewart, G.S., 1995. The significance of bacteria in stationary phase to food microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 263-275.
104. Roberts, A., Chan, Y., Wiedmann, M. (2005). Definition of genetically distinct attenuation mechanisms in naturally virulence-attenuated *Listeria monocytogenes* by comparative cell culture and molecular characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3900-3910.
105. Roche, S.M., Gracieux, P., Milohanic, E., Albert, I., Virlogeux-Payant, I., Témoin, S., Grépinet, O., Kerouanton, A., Jacquet, C., Cossart, P., Velge, P. (2005). Investigation of specific substitutions in virulence genes characterizing phenotypic groups of low-virulence field strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6039-6048.
106. 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. *Int. J. Food Microbiol.* 68, 33-44
107. Rouquette, C., Ripio, M.T., Pellegrini, E., Bolla, J.M., Tascon, R.I, Vázquez-Boland, J.A, Berche P. (1996). Identification of a ClpC ATPase required for stress tolerance and in vivo survival of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 21, 977-987.
108. Rouquette, C., de Chastellier, C., Nair, S., Berche, P. (1998). The ClpC ATPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages. *Mol. Microbiol.* 27, 1235-1245.
109. Salotra, P., Singh, D.K., Seal, K.P., Krishna, N., Jaffe, H., Bhatnagar, R. (1995). Expression of DnaK and GroEL homologs in *Leuconostoc esenteroides* in response to heat shock, cold shock or chemical stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 131, 57-62.
110. Schnupf, P., Portnoy, D.A., Decatur, A.L. (2006). Phosphorylation, ubiquitination and degradation of listeriolysin O in mammalian cells: role of the PEST-like sequence. *Cell Microbiol.* 8, 353-364.
111. Schulz, A., Schumann, W. (1996). hrcA, the first gene of the *Bacillus subtilis* dnaK operon encodes a negative regulator of class I heat shock genes. *J. Bacteriol.* 178, 1088-1093.

112. Schumann, W. (2003). The *Bacillus subtilis* heat shock stimulon. *Cell Stress Chaperones*. 8, 207-217.
113. Segal, R., Ron, E.Z. (1996). Regulation and organization of the *groE* and *dnaK* operons in Eubacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 138, 1-10.
114. Singh, R., Jamieson, A., Cresswell, P. (2008). GILT is a critical host factor for *Listeria monocytogenes* infection. *Nature*. 455, 1244-1247.
115. Skandamis P.N., Yoon Y., Stopforth J.D., Kendall P.A., Sofos J.N. (2008). Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiol.* 25, 294-303.
116. Skowyra, D., Georgopoulos, C., Zylicz, M. (1990). The *E. coli* *dnaK* gene product, the *hsp70* homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. *Cell*. 62, 939-944.
117. Sleator, R.D., Gahan, C.G., Abee, T., Hill, C. (1999). Identification and disruption of *BetL*, a secondary glycine betaine transport system linked to the salt tolerance of *Listeria monocytogenes* LO28. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2078-2083.
118. Sleator, R.D., Wouters, J., Gahan, C.G., Abee, T., Hill, C. (2001a). Analysis of the role of *OpuC*, an osmolyte transport system, in salt tolerance and virulence potential of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2692-2698.
119. Sleator, R.D., Gahan, C.G., Hill, C. (2001b). Identification and disruption of the *proBA* locus in *Listeria monocytogenes*: role of proline biosynthesis in salt tolerance and murine infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2571-2577.
120. Sleator, R.D., Gahan, C.G., Hill, C. (2001c). Mutations in the listerial *proB* gene leading to proline overproduction: effects on salt tolerance and murine infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4560-4565.
121. Sleator, R.D., Gahan, C.G., and Hill, C. (2003a). A postgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1-9.
122. Sleator, R.D., Hill, C. (2005). A novel role for the *LisRK* two-component regulatory system in listerial osmotolerance. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 599-601.
123. Smiddy, M., Sleator, R.D., Patterson, M.F., Hill, C., Kelly, A.L. (2004). Role for compatible solutes glycine betaine and L-carnitine in listerial barotolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7555-7557.
124. Smith, J.T., Hunters, E. (1988) Heat injury in *Listeria monocytogenes*: prevention by solutes. *Lebens-Wiss. Technol.* 21, 307-311.

125. Somolinos, M., Espina, L., Pagán, R., Garcia, D. (2010). sigB absence decreased *Listeria monocytogenes* EGD-e heat resistance but not its Pulsed Electric Fields resistance. *Int. J. Food Microbiol.* 141, 32-38.
126. Spiess, C., Beil, A., Ehrmann, M. (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell.* 97, 339-347.
127. Stack, H.M., Sleator, R.D., Bowers, M., Hill C., Gahan, C.G. (2005). Role for HtrA in stress induction and virulence potential in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4241-4247.
128. Stavru F., Archambaud C., Cossart P. (2011). Cell biology and immunology of *Listeria monocytogenes* infections: novel insights. *Immunol. Rev.* 240, 160-184.
129. Sue, D., Fink, D., Wiedmann, M., Boor, K.J. (2004). SigmaB-dependent gene induction and expression in *Listeria monocytogenes* during osmotic and acid stress conditions simulating the intestinal environment. *Microbiology.* 150, 3843-3855.
130. Swaminathan, B., Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis *Microbes Infect.* 9, 1236-1243.
131. Taylor, C.M., Beresford, M., Epton, H.A., Sigeo, 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. *J. Bacteriol.* 184, 621-628.
132. Thigpen M.C., Whitney C.G., Messonnier N.E., Zell E.R., Lynfield R., Hadler J.L., Harrison L.H., Farley M.M., Reingold A., Bennett N.M., Craig A.S., Schaffner W., Thomas A., Lewis M.M., Scallan E., Schuchat A. (2011). Emerging Infections Programs Network. Bacterial meningitis in the United States, 1998-2007. *N Engl J Med.* 364, 2016-25.
133. Tilney, L.G., Portnoy, D.A. (1989). Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell. Biol.* 109, 1597-1608.
134. van der Veen, S., Abee, T. (2010). HrcA DnaK are important for static and continuous-flow biofilm formation and disinfectant resistance in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology.* 156, 3782-3790.
135. van Schaik, W., Abee, T. (2005). The role of sigmaB in the stress response of Gram-positive bacteria—targets for food preservation and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 218-224.

136. Vázquez-Boland, J.A, Kuhn, M, Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 584-640.
137. Velge, P., Bottreau, E., Van-Langendonck, 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.
138. Verheul, A., Rombouts, F.M., Beumer, R.R., and Abee, T. (1995). An ATP-dependent L-carnitine transporter in *Listeria monocytogenes* Scott A is involved in osmoprotection. *J. Bacteriol.* 177, 3205-3212.
139. Verheul, A., Glaasker, E., Poolman, B., Abee, T. (1997). Betaine and L-carnitine transport by *Listeria monocytogenes* Scott A in response to osmotic signals. *J. Bacteriol.* 179, 6979-6985.
140. Voetsch, A.C., Angulo, F.J., Jones, T.F., Moore, M.R., Nadon, C., McCarthy, P., Shiferaw, B., Megginson, M.B., Hurd S., Anderson, B.J., Cronquist ,A., Vugia, D.J., Medus, C., Segler, S., Graves, L.M., Hoekstra, R.M., Griffin, P.M. (2007). Reduction in the incidence of invasive listeriosis in foodborne diseases active surveillance network sites, 1996-2003. *Clin. Infect. Dis.* 44, 513-520.
141. Wałęcka, E., Molenda, J., Bania, J. (2009). The impact of environmental stress on *Listeria monocytogenes* virulence. *Pol J Vet Sci.* 12, 575-579.
142. Wałęcka, E., Molenda, J., Karpíšková, R., Bania, J. (2011a). Effect of osmotic stress and culture density on invasiveness of *Listeria monocytogenes* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 440-445.
143. Wałęcka, E., Molenda, J., Karpíšková, R., Bania, J. (2011b). Effect of Heat Exposure on Invasiveness of *Listeria monocytogenes* Strains. *Foodborne Pathog. Dis.* 8, 839-841.
144. Wang, J., Hartling, J.A., Flanagan, J.M. (1997). The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell.* 91, 447-456.
145. Wemekamp-Kamphuis, H.H., Wouters, J.A., Sleator, R.D., Gahan, C.G., Hill, C., Abee, T. (2002). Multiple deletions of the osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC of *Listeria monocytogenes* affect virulence and growth at high osmolarity. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4710-4716.
146. Wemekamp-Kamphuis, H.H., Wouters, J.A., de Leeuw, P.P., Hain, T., Chakraborty, T., Abee, T. (2004). Identification of sigma factor sigma B-controlled genes and their

- impact on acid stress, high hydrostatic pressure, and freeze survival in *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3457-3466.
147. Werbrouck, H., Vermeulen, A., Van Coillie, E., Messens, W., Herman, L., Devlieghere, F., Uyttendaele, M. (2009). Influence of acid stress on survival, expression of virulence genes and invasion capacity into Caco-2 cells of *Listeria monocytogenes* strains of different origins. *Int. J. Food Microbiol.* 31, 140-146.
 148. Wesche A.M., Gurtler J.B., Marks B.P., Ryser E.T. (2009). Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *J Food Prot.* 72, 1121-1138.
 149. Wiedmann, M., Bruce, J.L., Keating, C., Johnson, A.E., McDonough, P.L., Batt, C.A. (1997). Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infect. Immun.* 65, 2707-2716.
 150. Wiedmann, M., Arvik, T.J., Hurley, R.J., Boor, K.J. (1998). General stress transcription factor sigmaB and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 180, 3650-3656.
 151. Wilson, R.L., Brown, L.L., Kirkwood-Watts, D., Warren, T.K., Lund, S.A., King, D.S., Jones, K.F., Hruby, D.E. (2006). *Listeria monocytogenes* 10403S HtrA is necessary for resistance to cellular stress and virulence. *Infect. Immun.* 74, 765-768.
 152. Wonderling, L.D., Wilkinson, B.J., Bayles, D.O. (2004). The htrA (degP) gene of *Listeria monocytogenes* 10403S is essential for optimal growth under stress conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1935-1943.
 153. Woo, K.M., Chung, W.J., Ha, D.B., Goldberg, A.L., Chung, C.H. (1989). Protease Ti from *Escherichia coli* requires ATP hydrolysis for protein breakdown but not for hydrolysis of small peptides. *J. Biol. Chem.* 264, 2088-2091.
 154. Wood, J.M. (1999). Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol. Mol. Biol Rev.* 63, 230-262. Review.
 155. Wood, J.M. (2007). Bacterial osmosensing transporters. *Methods Enzymol.* 428, 77-107.
 156. Yousef, A.E., Polly D.C. (2002). Basics of Stress Adaptation and Implications in New-Generation Foods. In *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*, Yousef, A.E. and Juneja, V.K., ed. (CRC Press LLC), pp. 1-30.

157. Yura, T., Nakahigashi, K. (1999). Regulation of the heat-shock response. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 153-158.
158. Zhang D.L., Ross T., Bowman J.P. (2010). Physiological aspects of *Listeria monocytogenes* during inactivation accelerated by mild temperatures and otherwise non-growth permissive acidic and hyperosmotic conditions. *Int J Food Microbiol.* 141, 177-185.
159. Zhang, C., Zhang, M., Ju J., Nietfeldt, J., Wise, J., Terry, P.M., Olson, M., Kachman, S.D., Wiedmann, M., Samadpour, M., Benson, A.K. (2003). Genome diversification in phylogenetic lineages I and II of *Listeria monocytogenes*: identification of segments unique to lineage II populations. *J. Bacteriol.* 185, 5573-5584.
160. Zhou, X., Jiao, X., and Wiedmann, M. (2005). *Listeria monocytogenes* in the Chinese food system: strain characterization through partial actA sequencing and tissue-culture pathogenicity assays. *J. Med. Microbiol.* 54, 217-224
161. Ziegler, C., Bremer, E., Krämer, R. (2010). The BCCT family of carriers: from physiology to crystal structure. *Mol. Microbiol.* 78, 13-34.
162. Zuber, U., Schumann, W. (1994). CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon dnaK of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 176, 1359-1363.