

PERSISTENCE OF *L. MONOCYTOGENES* VERSUS ADHERENCE ON SOLID SURFACE

Janka Koreňová, Katarína Oravcová

## ABSTRACT

*Listeria monocytogenes* is an important food-borne pathogen that frequently persists in food-processing environments despite rigorous sanitation procedures. Specific phenotypes that have been linked to persistence have been previously investigated but no clear association has been demonstrated. In this study we characterised four persistent *L. monocytogenes* strains isolated from food factories in Austria, Czech Republic, Denmark and Ireland in comparison with four non-persistent counterparts. The *L. monocytogenes* isolates were analysed for the ability to form biofilm during exponential/stationary growth phase at different temperature at low nutrition stress and adhesion to polystyrene at high-salinity conditions. Persistent and non-persistent strains did not significantly differ in the ability to form biofilm or to adhere to polystyrene microtitre plate.

**Keywords:** biofilm, *Listeria monocytogenes*, persistence

## ÚVOD

*Listeria monocytogenes* je významný potravinový patogén spôsobujúci listeriózu, ochorenie s vysokou mierou mortality v rizikových skupinách obyvateľstva (Farber a Peterkin, 1991). Syry, ryby (losos), lahôdky obsahujúce mäso alebo vajcia a zelenina sú považované za najviac frekventované nosiče tohto patogénu (Lianou a Sofos 2007). Najmä v oblasti produkcie syra a mäsa *L. monocytogenes* najčastejšie kontaminuje výrobné zariadenia, kde je určité množstvo kmeňov schopných perzistovať napriek prísny sanitacným procedúram (Lundén et al., 2003). Perzistencia sa predpokladá v spojitosti s posilnenou adherenciou a s potenciálnou tvorbou biofilmu na plochách prichádzajúcich do priameho kontaktu s potravinou (Borucki et al., 2003; Moretro a Langsrud, 2004).

V tejto práci uvádzame výsledky analýzy ôsmich nezávislých izolátov *L. monocytogenes* zo štyroch európskych krajín. Výber reprezentujú štyri kmene perzistujúcich kontaminantov v potravinárskych výrobných v porovnaní so štyrmi kmeňmi, ktoré boli izolované z výroby, alebo z výrobkov len sporadicky a teda sa predpokladá, že sú neperzistentné. Všetky kmene boli hodnotené z hľadiska tvorby biofilmu a adherencie na pevný povrch v rôznych rastových fázach, teplotných podmienkach, a podmienkach zvýšenej koncentrácie soli za účelom identifikácie perzistujúcich kmeňov vzhľadom na fenotypové vlastnosti.

**Tab. 1** Použité kmene *L. monocytogenes* charakterizované podľa frekvencie izolácie (opísané vyššie)

Kmeň č.	Perzistentné				Neperzistentné				Kontrola
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Krajina pôvodu a miesto izolácie	Výrobňa B (voda)	SYR	Udiareň 1	Výrobňa syra	Výrobňa B	SYR	Udiareň 2	SYR	LM EGD
	Rakúsko	Írsko	Dánsko	ČR	Rakúsko	Írsko	Dánsko	ČR	Kontrolný kmeň

## MATERIÁL A METÓDY

## Bakteriálne kmene

Boli použité štyri kmene *L. monocytogenes*, izolované v r. 1996 – 2007 opakovane (perzistentné), a štyri kmene *L. monocytogenes*, izolované v r. 1999 – 2008 sporadicky (neperzistentné), doplnené *L. monocytogenes* EGD, ako kontrolným kmeňom (Tab. 1). Kmene boli kultivované v tryptón-sójovom bujóne (TSB; Merck, Darmstadt, Germany) pri 37 °C, s trepaním pri 120 rpm, počas 18 -20 h – základná suspenzia.

## Tvorba biofilmu

Suspenzie buniek boli nanášané po 100 µl do jamiek 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky z priehľadného polystyrénu (Sarstedt, Nemecko). Biofilm bol kvantifikovaný spektrofotometrickou metódou s kryštálovou violeťou v šiestich paralelných meraniach (Koreňová et al., 2009). Priemerné hodnoty boli vypočítané po vylúčení odľahlých výsledkov aplikáciou Q-testu (Dean a Dixon, 1951). Významnosť rozdielov v percentuálne vyjadrenej miere tvorby biofilmu medzi jednotlivými skupinami kmeňov bola stanovená porovnávacím testom podľa Tukeya (One-way ANOVA, GraphPad Prism 5.0, GraphPad Software, Inc., USA).

## Vplyv rôznej rastovej fázy buniek a teploty na tvorbu biofilmu

Zo základnej suspenzie boli pripravené dve suspenzie buniek v rôznej fáze rastu.

(A) Neskorá exponenciálna až skorá stacionárna fáza rastu bola pripravená po centrifugácii základnej suspenzie buniek pri 4000 rpm, 20 min, 20 °C, výmenou TSB média za čerstvé v objeme, aby sa dosiahla OD<sub>600</sub> 0,5 (3.10<sup>9</sup> - 5.10<sup>9</sup> KTJ.ml<sup>-1</sup>).

(B) Kultúry v skorej až strednej exponenciálnej fáze boli pripravené po centrifugácii základnej suspenzie buniek, výmenou TSB média za čerstvé v takom istom objeme. Po krátkej kultivácii (37 °C, 2 – 3 h) sa dosiahla OD<sub>600</sub> 0,1 – 0,2 (cca 5.10<sup>8</sup> - 1.10<sup>9</sup> KTJ.ml<sup>-1</sup>). Vplyv rôznej rastovej fázy buniek a teploty na tvorbu biofilmu bol sledovaný nanesením suspenzie (A) a (B) na mikrotitračnú doštičku, tvorba biofilmu prebiehala pri 20 °C, 37 °C a 40 °C počas 20 – 24 h.

## Vplyv limitovaného zdroja živín a teploty na tvorbu biofilmu

V suspenzii (B) bolo po centrifugácii vymenené médium za čerstvé 10 x zriedené médium TSB. 100 µl

suspenzie bolo nanášaných na mikrotitračné doštičky, tvorba biofilmu prebiehala pri 20 °C, 37 °C a 40 °C počas 20-24 h, resp. pri teplote 4 °C počas 5 dní.

Vplyv zvýšenej koncentrácie NaCl na adhérenciu buniek

Suspensia kmeňov bola pripravená kultiváciou pri 20 °C, počas 40 h v TSB a TSB + 10 % NaCl. Po centrifugácii za podmienok opísaných vyššie boli bunky premyté a nariadené v peptónovej vode na koncentráciu cca 10<sup>7</sup> KTJ.ml<sup>-1</sup> (OD<sub>600</sub> 0,025). 100µl suspenzie bolo nanášaných na mikrotitračné doštičky, adhérenca na polystyrén prebiehala pri 20 °C počas 4 h.

**VÝSLEDKY A DISKUSIA**

*Vplyv rôznej rastovej fázy buniek a teploty na tvorbu biofilmu*

Všetky kmene boli schopné tvoriť biofilm bez ohľadu na ich rastovú fázu. Tvorba celkového biofilmu varírovala u jednotlivých kmeňov za rôznych podmienok s odchýlkou ± 20 – 30 % bez ohľadu na charakter kmeňov z hľadiska perzistentnosti. Pri skúšaných teplotách 20 °C, 37 °C, 40 °C boli všetky kmene schopné tvoriť biofilm v rovnakom pomere ako pri referenčnej teplote 37°C. Najvyššia schopnosť tvorby biofilmu z perzistentných kmeňov bola pozorovaná u kmeňa 2 a 3, najnižšia u kmeňov 1 a 4. Kmeň č. 5 (neperzistentný) mal osobitné postavenie z hľadiska kvantity tvorby biofilmu, tvoril biofilm v rovnakej až väčšej miere, ako perzistentné kmene a pri všetkých testovaných teplotách (Tab. 2, 3).

Schopnosť tvoriť biofilm je považovaná za najpravdepodobnejšiu vlastnosť v súvislosti s perzistentným fenotypom *L. monocytogenes* v potravinárskych výrobách (Borucki et al., 2003;

Moretro a Langsrud, 2004). Hypotézu podporuje skutočnosť, že biofilmy sú značne rezistentné voči čisteniu a dezinfekcii (Lelieveld, 2006; Grinstead, 2009). Jedným z faktorov, ktoré ovplyvňujú schopnosť tvorby biofilmu u jednotlivých kmeňov, je rôzna fáza rastu buniek (Chavant et al., 2002; Rodrigues et al., 2009). Napriek týmto poznatkom, počiatkové experimenty porovnávania tvorby biofilmu perzistentných a neperzistentných kmeňov nepreukázali značný rozdiel medzi týmito skupinami, ani vzhľadom na ich rastovú fázu.

*Vplyv nízkej hladiny živín a teploty na tvorbu biofilmu*

Prírodné podmienky prostredia potravinárskych výrob poskytujú nepravidelný a obmedzený prísun živín pre mikroorganizmy na povrchoch, pre ktoré tento nutričný stres predstavuje významný vplyv na posilnenie adhérencie a tvorbu biofilmu (Djordjevic et al., 2002; Rodrigues et al., 2009). V našich experimentoch všetky skúšané kmene kultivované v limitných nutričných podmienkach tvorili biofilm pri testovaných teplotách 4 °C, 20 °C, 37 °C, 40 °C bez významných rozdielov vzhľadom na ich perzistenciu (Tab. 4).

*Vplyv zvýšenej koncentrácie NaCl na adhérenciu buniek*

Zvýšená adhézia buniek listérií na polystyrén vplyvom zvýšenej koncentrácie soli v prostredí bola popísaná ako dôsledok tvorby flagel (Kalmokoff et al., 2001; Caly et al., 2009). V prostredí so zvýšenou koncentráciou soli (TSB+10 % NaCl), za zaznamenala zvýšená adhérenca väčšiny skúšaných kmeňov. Zvýšenie adhérencie kmeňov nebolo v korelácii s ich perzistenciou (Tab. 5). Opäť, bunky kmeňa č. 5 prejavili silnejšiu adhérenciu, ako niektoré perzistentné kmene. Tento kmeň prejavil tiež zvýšenú schopnosť tvoriť biofilm za rôznych podmienok, ako bolo

**Tab. 2** Kvantita biofilmu (BF) kmeňov *L. monocytogenes* v neskoršej exponenciálnej až skorej stacionárnej fáze rastu vytvorenom pri teplote 20 °C a 37 °C, nameraná ako optická denzita pri 570 nm po farbení biofilmu s kryštálovou violeťou (OD<sub>CV</sub>), priemer zo šiestich paralelných meraní, SD – smerodajná odchýlka

20°C				37°C			
Kmeň č.	OD <sub>CV</sub>	± SD	% BF	Kmeň č.	OD <sub>CV</sub>	± SD	%BF
2	0,3328	0,0656	100	3	0,4023	0,2050	100
5	0,2320	0,0445	69,7	2	0,3358	0,0319	83,5
3	0,2258	0,0507	67,9	5	0,3263	0,0666	81,1
8	0,1916	0,0152	57,6	6	0,228	0,0227	56,7
6	0,1573	0,0273	47,3	1	0,2058	0,0443	51,2
4	0,1446	0,0481	43,5	8	0,1840	0,0479	45,7
1	0,1341	0,0144	40,3	4	0,1798	0,0155	44,7
7	0,1213	0,0190	36,5	7	0,1508	0,0302	37,5
9	0,1106	0,0428	33,2	9	0,0605	0,0206	15,0

**Tab. 3** Kvantita biofilmu kmeňov *L. monocytogenes* v skorej až strednej exponenciálnej fáze rastu vytvorenom pri teplote 20°C, 37°C a 40°C, nameraná po farbení biofilmu s kryštálovou violeťou

20 °C				37 °C				40 °C			
Kmeň	OD <sub>CV</sub>	± SD	% BF	Kmeň	OD <sub>CV</sub>	± SD	% BF	Kmeň	OD <sub>CV</sub>	± SD	% BF
2	0,190	0,088	100,0	3	0,236	0,058	100,0	5	0,168	0,036	100,0
1	0,170	0,089	89,3	5	0,230	0,049	97,7	8	0,161	0,076	95,8
5	0,129	0,019	67,9	2	0,191	0,017	80,9	2	0,120	0,036	71,4
3	0,124	0,062	65,3	6	0,171	0,049	72,5	3	0,115	0,039	68,7
6	0,091	0,022	47,9	1	0,170	0,031	72,3	9	0,111	0,039	66,1
4	0,066	0,031	34,9	9	0,168	0,073	71,3	1	0,086	0,034	51,5
7	0,054	0,023	28,2	8	0,153	0,062	64,8	4	0,073	0,018	43,8
9	0,049	0,019	25,6	4	0,138	0,011	58,7	6	0,072	0,014	43,1
8	0,030	0,010	16,0	7	0,094	0,035	39,8	7	0,067	0,022	40,2

**Tab. 4** Kvantita biofilmu kmeňov *L. monocytogenes* v podmienkach limitovaného zdroja živín vytvorenom pri teplote 4 °C, 20 °C, 37 °C a 40 °C, nameraná po farbení biofilmu s kryštálovou vioľou

4°C, 5 dní			20 °C, 20 h			37 °C, 20 h			40 °C, 20 h		
Kmeň č.	OD <sub>CV</sub>	% BF	Kmeň č.	OD <sub>CV</sub>	% BF	Kmeň č.	OD <sub>CV</sub>	% BF	Kmeň č.	OD <sub>CV</sub>	% BF
5	0,303	100,0	3	0,171	100,0	5	0,199	100,0	5	0,302	100,0
2	0,153	50,5	2	0,163	94,9	2	0,185	92,8	2	0,259	86,0
6	0,140	46,1	5	0,158	92,4	9	0,166	83,3	3	0,248	82,2
4	0,130	44,9	9	0,120	70,3	3	0,165	83,1	8	0,201	66,7
7	0,119	39,3	1	0,097	56,7	8	0,119	59,7	1	0,178	59,0
3	0,114	37,6	8	0,087	50,8	6	0,088	44,4	9	0,169	56,2
1	0,095	31,3	7	0,083	48,2	4	0,088	44,3	6	0,144	47,7
8	0,083	27,5	4	0,072	41,8	7	0,079	39,7	4	0,128	42,6
9	0,063	20,6	6	0,059	34,7	1	0,075	37,7	7	0,105	34,9

**Tab. 5** Adherencia (BF) buniek *L. monocytogenes* na polystyrén v podmienkach zvýšenej koncentrácie NaCl (TSB+10 %) pri teplote 20 °C počas 4 h, nameraná po farbení s kryštálovou vioľou

TSB				TSB+10%NaCl			
Kmeň č.	OD <sub>CV</sub>	± SD	% BF	Kmeň č.	OD <sub>CV</sub>	± SD	% BF
3	0,042	0,014	100,0	6	0,115	0,043	100,0
2	0,038	0,009	90,5	4	0,093	0,032	80,3
1	0,035	0,009	82,1	1	0,056	0,012	48,3
5	0,034	0,007	79,8	5	0,051	0,022	43,8
4	0,030	0,009	71,8	7	0,050	0,012	43,6
6	0,012	0,002	29,4	2	0,046	0,017	39,6
7	0,012	0,015	28,6	3	0,032	0,013	28,0
8	0,006	0,002	13,7	8	0,012	0,005	10,1
9	0,004	0,002	9,9	9	0,006	0,005	5,4

popísané vyššie.

Zo súhrnného zhodnotenia tvorby biofilmu a adherencie buniek testovaných kmeňov za všetkých podmienok (rastové fázy, teplota, TSB/TSB+10 % NaCl) a štatistického zhodnotenia vyplýva, že kmene 2 a 3 zo skupiny perzistentných kmeňov s mierou tvorby biofilmu a adherencie 80% – 81% sú významne odlišné od neperzistentných kmeňov ( $p < 0,01$ ), okrem kmeňa 5. Kmeň 5 má výnimočné postavenie, odlišuje sa od skupiny ostatných neperzistentných kmeňov 6, 7, 8 a kontrolného kmeňa 9 a od dvoch perzistentných kmeňov 1 a 4 ( $p < 0,01$ ). Miera tvorby biofilmu a adherencie kmeňa č. 5 a perzistentných kmeňov č. 2 a 3 bola v priemere 80 % až 88 %, tieto kmene sa najviac odlišovali od ostatných hodnotených kmeňov ( $p < 0,01$ ). Zo skupiny perzistentných kmeňov sa vyníma kmeň 4, spolu s neperzistentnými a kontrolným kmeňom dosiahli mieru tvorby biofilmu priemerne 38 – 50 % a tvoria skupinu významne odlišnú od ostatných kmeňov ( $p < 0,01$ ).

## ZÁVER

Z jednotlivých výsledkov testovania daného súboru kmeňov *L. monocytogenes* izolovaných z prostredia potravinárskych výrob a výrobkov nie sú jasné korelácie medzi mierou tvorby biofilmu a adherencie s perzistenciou kmeňov. Súhrnné zhodnotenie priemerných percentuálnych hodnôt tvorby biofilmu a adherencie buniek testovaných kmeňov zo všetkých meraní však zaraďuje všetky perzistentné kmene do hornej polovice poradia podľa miery tvorby biofilmu, opäť s výnimočným postavením kmeňa č. 5, ktorého

priemerná percentuálna tvorba biofilmu zo všetkých meraní bola najvyššia.

## LITERATÚRA

- BORUCKI, M. K., PEPPIN, J. D., WHITE, D., LOGE, F., and CALL, D. R. 2003. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. In *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, 2003, p. 7336-7342.
- CALY, D., TAKILT, D., LEBRET, V. and TRESSE, O. 2009. Sodium chloride affects *Listeria monocytogenes* adhesion to polystyrene and stainless steel by regulating flagella expression. In *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 49, 2009, p. 751-756.
- CHAVANT, P., MARTINIE, B., MEYLHEUC, T., BELLON-FONTAINE, M. N., HEBRAUD, M. 2002. *Listeria monocytogenes* LO28: Surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. In *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, 2002, p. 728-737.
- DEAN, R. B., DIXON, W. J. 1951. Simplified statistics for small numbers of observations. In *Anal. Chem.*, vol. 23, 1951, p. 636-638.
- DJORDJEVIC, D., WIEDMANN, M., McLANDSBOROUGH, L. A. 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. In *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, 2002, p. 2950-2958.
- FARBER, J. M., PETERKIN, P. I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. In *Microbiol. Rev.*, vol. 55, 1991, p. 476-511.
- GRINSTEAD, D. 2009. Cleaning and sanitation in food processing environments for the prevention of biofilm formation, and biofilm removal. In *Biofilms in the Food and Beverage Industries* ed. Fratamico, P. M., Annous B. A. and Gunther IV, N. W. pp. 331-358. Cambridge: Woodhead Publishing.

KALMOKOFF, M. L., AUSTIN, J. W., WAN, X. D., SANDERS, G., BANERJEE, S., FARBER, J. M. 2001. Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. In *J. Appl. Microbiol.*, vol. 91, 2001, p. 725-734.

KOREŇOVÁ, J., LOPAŠOVSKÁ, J., KUČHTA, T. 2009. Biofilm forming bacterial contaminants in small and medium-sized ewes' milk and meat processing enterprises in Slovakia. In *J. Food Nutr. Res.*, vol. 48, 2009, p. 115-120.

LELIEVELD, H. L. M. 2006. Sources of contamination. In *Hygiene in Food Processing* ed. Lelieveld, H. L. M, Mostert, M. A. and White, B, pp. 61-75. Cambridge: Woodhead Publishing.

LIANOU, A., SOFOS, J. N. 2007. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. In *J. Food Prot.*, vol. 70, 2007, p. 2172-2198.

LUNDÉN, J., AUTIO, T., KORKEALA, H. 2003. Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. In *J. Food Prot.*, vol. 66, 2003, p. 2062-2069.

MORETRO, T., LANGSRUD, S. 2004. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. In *Biofilms*, vol. 1, 2004, p. 107-121.

RODRIGUES, D. A., ALMEIDA, M. A., TEIXEIRA, P. A., OLIVEIRA, R. T. and AYEREDO, J. C. 2009. Effect of batch and fed-batch growth modes on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* at different temperatures. In *Curr. Microbiol.*, vol. 59, 2009, p. 457-462.

**Acknowledgments:**

Práca bola podporovaná medzinárodným projektom BIOTRACER - Integrated Project within the European Union 6th Framework Programme under the European Research area of Food Quality and Safety. FP6-2006-FOOD-036272.

**Contact address:**

Ing. Janka Koreňová, Food research Institute in Bratislava, Department of Microbiology, Molecular Biology and Biotechnology, Priemyselná 4, P.O.Box 25, 824 75 Bratislava 26, Slovakia, Tel.: 02/50237156, E-mail: korenova@vup.sk

Ing. Katarína Oravcová, Food research Institute in Bratislava, Department of Microbiology, Molecular Biology and Biotechnology, Priemyselná 4, P.O.Box 25, 824 75 Bratislava 26, Slovakia, Tel.: 02/50237156, E-mail: oravcova@vup.sk