

IOSUD – UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI

Școala doctorală de Inginerie Mecanică și Industrială



TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

Construcția a două tulpini mutante de *Listeria monocytogenes* în vederea evidențierii mecanismului de rezistență a bacteriei la presiuni înalte și caracterizarea acestora

Doctorand,

Ing. Florentina Ionela BUCUR

Conducător științific,

Prof. univ. dr. ing. Anca Ioana NICOLAU

Seria I 4: Inginerie Industrială Nr. 75

GALAȚI

2020



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

Programul Operațional Capital Uman

Axa prioritară 6 - Educație și competențe

Proiect: Burse pentru educația antreprenorială în rândul doctoranzilor și cercetătorilor postdoctorat (BeAntreprenor!)

Cod MySMIS: 124539

TEZĂ DE DOCTORAT

Construcția a două tulpini mutante de *Listeria monocytogenes* în vederea evidențierii mecanismului de rezistență a bacteriei la presiuni înalte și caracterizarea acestora

Doctorand,

Ing. Florentina Ionela BUCUR

Conducător științific,

Prof. univ. dr. ing. Anca Ioana NICOLAU

Lucrare realizată în cadrul proiectelor

„Development of a novel industrial process for safe, sustainable and higher quality foods, using biotechnology and cybernetic approach” - **SafeFood - ERANET**

Contract nr. 15/2017

și

„Burse pentru educația antreprenorială în rândul doctoranzilor și cercetătorilor postdoctorat” – **BeAntreprenor!**

Contract nr. 51680/09.07.2019 POCU/380/6/13 – Cod SMIS: 124539

Titlurile și drepturile de proprietate intelectuală și industrială asupra rezultatelor obținute în cadrul stagiului de cercetare doctorală aparțin Universității „Dunărea de Jos” din Galați

Punctele de vedere exprimate în lucrare aparțin autorului și nu angajează Comisia Europeană și Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați, beneficiara proiectelor.

COMISIA DE DOCTORAT

Președinte
Conducător științific
Referenți științifici

Prof. dr. ing. Petru Alexe
Prof. dr. ing. Anca Ioana Nicolau
Prof. dr. biol. Mariana Carmen Chifiriuc
Prof. dr. ing. Mona Elena Popa
Prof. dr. ing. Daniela Borda

Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
Universitatea din București
USAMV București
Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați

Seria I 4: Inginerie Industrială Nr. 75 GALAȚI 2020



Seriile tezelor de doctorat susținute public în UDJG începând cu 1 octombrie 2013 sunt:

Domeniul fundamental ȘTIINȚE INGINEREȘTI

- Seria I 1: **Biotehnologii**
- Seria I 2: **Calculatoare și tehnologia informației**
- Seria I 3: **Inginerie electrică**
- Seria I 4: **Inginerie industrială**
- Seria I 5: **Ingineria materialelor**
- Seria I 6: **Inginerie mecanică**
- Seria I 7: **Ingineria produselor alimentare**
- Seria I 8: **Ingineria sistemelor**
- Seria I 9: **Inginerie și management în agicultură și dezvoltare rurală**

Domeniul fundamental ȘTIINȚE SOCIALE

- Seria E 1: **Economie**
- Seria E 2: **Management**
- Seria SSEF: **Știința sportului și educației fizice**

Domeniul fundamental ȘTIINȚE UMANISTE ȘI ARTE

- Seria U 1: **Filologie- Engleză**
- Seria U 2: **Filologie- Română**
- Seria U 3: **Istorie**
- Seria U 4: **Filologie - Franceză**

Domeniul fundamental MATEMATICĂ ȘI ȘTIINȚE ALE NATURII

- Seria C: **Chimie**

Domeniul fundamental ȘTIINȚE BIOLOGICE ȘI BIOMEDICALE

- Seria M: **Medicină**

Cuprins

	Rezumat	Teză
Mulțumiri		
Justificarea temei de cercetare și obiectivele științifice ale acesteia	i	i
Structura tezei de doctorat	iii	iii
Lista de abrevieri și simboluri		vi
Lista tabelor		xi
Lista figurilor		xiii
Capitolul I. Implicații ale bacteriei patogene <i>Listeria monocytogenes</i> privind siguranța alimentelor	1	1
1.1. <i>Listeria monocytogenes</i> , o bacterie patogenă ubicuitară		1
1.1.1. Genul <i>Listeria</i>		1
1.1.2. <i>Listeria monocytogenes</i>		1
Scurt istoric		1
Caracteristici fenotipice		2
Serotipuri		2
Patogenitate		2
1.1.3. <i>L. monocytogenes</i> în mediul de procesare a alimentelor		4
1.1.4. Epidemii de listerioză și produse alimentare implicate		4
1.1.5. Politici adoptate în vederea reducerii incidenței <i>L. monocytogenes</i> în alimente		7
1.2. Rezistența <i>Listeriei monocytogenes</i> la factori de stres asociați cu industria alimentară		8
1.2.1. Rezistența <i>L. monocytogenes</i> la stres în timpul procesării alimentelor și al depozitării acestora		10
Rezistența <i>L. monocytogenes</i> la stres termic		10
Rezistența <i>L. monocytogenes</i> la tratamente termice		10
Rezistența <i>L. monocytogenes</i> la temperaturi scăzute		13
Rezistența <i>L. monocytogenes</i> la aciditate		14
Rezistența <i>L. monocytogenes</i> la stres osmotic		16
Rezistența <i>L. monocytogenes</i> la bacteriocine		18
1.2.2. Rezistența <i>L. monocytogenes</i> la stres în timpul procesării și decontaminării alimentelor cu ajutorul tehnologiilor alternative		21
Rezistența <i>L. monocytogenes</i> la presiuni înalte	1	21
Rezistența <i>L. monocytogenes</i> la lumină UV		23
Rezistența <i>L. monocytogenes</i> la câmpuri electrice pulsatorii		24
Rezistența <i>L. monocytogenes</i> la stres oxidativ		25
1.3. Concluzii		27
Capitolul II. Materiale și echipamente	2	28

2.1. Materiale		28
2.1.1. Tulpini bacteriene și vectori plasmidiali	2	28
2.1.2. Medii de cultură		29
2.1.3. Antibiotice		32
2.1.4. Kit-uri pentru biologie moleculară		32
2.1.5. Soluții tampon		33
2.1.6. Enzime, nucleotide și substanțe chimice		34
2.1.7. Consumabile de laborator și sticlărie		38
2.1.8. Software-uri și baze de date		39
2.2. Echipamente și aparatură de laborator		39
Capitolul III. Construcția tulpinilor mutante, <i>Listeria monocytogenes</i> EGDe ΔImo1013 și <i>Listeria monocytogenes</i> EGDe ΔImo2229	4	41
3.1. Introducere		41
3.2. Materiale și metode		42
3.2.1. Conservarea și cultivarea tulpinilor bacteriene		42
3.2.2. Obținerea celulelor bacteriene competente		42
Obținerea, pe cale chimică, a celulelor de <i>E. coli</i> EC10B competente		42
Obținerea celulelor de <i>L. monocytogenes</i> EGDe electrocompetente		43
3.2.3. Izolarea ADN-ului genomic		43
3.2.4. Amplificarea regiunilor de flancare a genelor țintă		45
3.2.5. Electroforeza fragmentelor de ADN în gel de agaroză		45
3.2.6. Purificarea fragmentelor de ADN din gelul de agaroză		46
3.2.7. Digestia vectorului pORI280 cu endonucleaza de restricție <i>Pst</i> I		47
3.2.8. Asamblarea Gibson a fragmentelor de ADN		47
3.2.9. Transformarea celulelor de <i>E. coli</i> EC10B prin metoda șocului termic		49
3.2.10. Testarea transformanților <i>E. coli</i> EC10B prin Colony PCR		49
3.2.11. Izolarea vectorilor recombinanți din celulele de <i>E. coli</i> EC10B transformante		50
3.2.12. Digestia vectorilor recombinanți cu endonucleazele de restricție <i>Bgl</i> II și <i>Not</i> I		51
3.2.13. Transformarea celulelor de <i>L. monocytogenes</i> EGDe prin electroporare		52
3.2.14. Protocolul privind deleția genelor țintă		52
3.2.15. Identificarea clonelor mutante prin Colony PCR		53
3.3. Rezultate și discuții	4	54
3.4. Concluzii	9	62
Capitolul IV. Caracterizarea fenotipică a tulpinilor mutante construite, <i>Listeria monocytogenes</i> EGDe ΔImo1013 și <i>Listeria monocytogenes</i> EGDe ΔImo2229	9	64

4.1. Introducere		64
4.2. Materiale și metode		65
4.2.1. Determinarea dinamicii de creștere		65
4.2.2. Analiza SEM		66
4.2.3. Evaluarea motilității		66
4.2.4. Cuantificarea biofilmului		67
4.2.5. Analiza statistică a rezultatelor experimentale		67
4.3. Rezultate și discuții	9	67
4.3.1. Determinarea dinamicii de creștere, la temperatura de 37°C, a tulpinilor mutante de <i>L. monocytogenes</i>	9	70
4.3.2. Determinarea caracteristicilor morfologice ale celulelor de <i>L. monocytogenes</i> mutante	11	74
4.3.3. Motilitatea tulpinilor de <i>L. monocytogenes</i> mutante	13	76
4.3.4. Capacitatea tulpinilor de <i>L. monocytogenes</i> mutante de a forma biofilm	15	78
4.4. Concluzii	16	
Capitolul V. Rezistența tulpinilor mutante, <i>Listeria monocytogenes</i> EGDe ΔImo1013 și <i>Listeria monocytogenes</i> ΔImo2229, la presiuni înalte și alți factori de stres asociați cu produsele alimentare	17	79
5.1. Introducere		79
5.2. Materiale și metode		80
5.2.1. Conservarea și cultivarea tulpinilor bacteriene		80
5.2.2. Tratamentul la presiuni înalte		81
5.2.3. Determinarea concentrației minime inhibitorii de NaCl		81
5.2.4. Inducerea șocului hipoosmotic		82
5.2.5. Determinarea concentrației minime inhibitorii de nizină		82
5.2.6. Analiza statistică a rezultatelor experimentale		83
5.3. Rezultate și discuții	17	83
5.3.1. Rezistența tulpinilor mutante de <i>L. monocytogenes</i> la tratamentul la presiuni înalte	17	83
5.3.2. Rezistența tulpinilor mutante de <i>L. monocytogenes</i> la stresul osmotic	19	85
Rezistența la stresul hiperosmotic	19	85
Rezistența la șocul hipoosmotic	20	86
5.3.3. Rezistența tulpinilor mutante de <i>L. monocytogenes</i> la nizină	21	87
5.4. Concluzii	23	90
Capitolul VI. Evaluarea efectului combinat al procesării la presiuni înalte și nizină asupra capacității <i>Listeriei monocytogenes</i> de a supraviețui pe șuncă gata pentru consum	24	91
6.1. Introducere		92

6.2. Materiale și metode		92
6.2.1. Selecția unei tulpini de <i>L. monocytogenes</i> cu barotoleranță crescută		92
6.2.2. Testul de sensibilitate la nizină		93
6.2.3. Analiza fizico-chimică a matricei alimentare		93
6.2.4. Pregătirea celulelor de <i>L. monocytogenes</i> în vederea contaminării artificiale a matricei alimentare		93
6.2.5. Pregătirea probelor de șuncă de Praga și contaminarea artificială a acestora cu <i>L. monocytogenes</i>		94
6.2.6. Tratamentul la presiuni înalte, cu sau fără nizină, al probelor de șuncă de Praga contaminate		94
6.2.7. Determinarea viabilității celulelor de <i>L. monocytogenes</i>		95
6.2.8. Dezvoltarea modelului predictiv		95
6.2.9. Analiza statistică a rezultatelor experimentale		96
6.3. Rezultate și discuții	24	96
6.3.1. Selecția unei tulpini de <i>L. monocytogenes</i> cu barotoleranță crescută	24	97
6.3.2. Evaluarea rezistenței <i>L. monocytogenes</i> la nizină	25	98
6.3.3. Caracterizarea matricei alimentare	25	98
6.3.4. Creșterea <i>L. monocytogenes</i> , în prezența sau absența nizinei, pe șunca de Praga depozitată în condiții de refrigerare	26	99
6.3.5. Efectul tratamentului la presiuni înalte, cu sau fără nizină, asupra supraviețuirii <i>L. monocytogenes</i> pe șunca de Praga	26	100
6.3.6. Aplicarea modelării predictive în vederea determinării probabilității de recuperare a <i>L. monocytogenes</i> pe șunca de Praga procesată	28	101
6.4. Concluzii	29	104
Concluzii finale, contribuții originale și perspective de cercetare		105
Concluzii finale	30	105
Contribuții originale	32	107
Perspective de continuare a cercetării	32	107
Anexe		109
Referințe bibliografice	33	115
Diseminarea rezultatelor obținute pe durata studiilor doctorale	36	155
Curriculum Vitae		159

Cuvinte cheie: *Listeria monocytogenes*, procesare la presiuni înalte, siguranță alimentară, rezistență la stres, industrie alimentară, mutagenезă situs direcționată, canale ionice mecanosenzitive, proteine de legare a penicilinei, nizină, tehnologia obstacolelor, modelare predictivă

Justificarea temei de cercetare și obiectivele științifice ale acesteia

Alimentația reprezintă un aspect esențial al vieții, iar siguranța acesteia constituie, în consecință, un drept fundamental al omenirii. Din păcate, consumul de alimente contaminate cu agenți biologici patogeni continuă să cauzeze boli severe care afectează, anual, milioane de persoane, dintre care sute de mii decedază. Toxiinfecțiile alimentare sunt cauzate, în proporție de peste 90%, de specii de bacterii patogene aparținând genurilor *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria* și *Clostridium*. Deși infecția cu speciile patogene de *Listeria* (listerioza), în principal *L. monocytogenes*, este mai rară, rata ridicată de mortalitate asociată acesteia constituie un motiv de îngrijorare publică semnificativ. În anul 2018, Autoritatea Europeană pentru Siguranță Alimentară a arătat că incidența listeriozei urmează un trend ascendent în Europa, înregistrând cea mai ridicată rată de mortalitate dintre îmbolnăvirile cauzate de bacterii patogene de origine alimentară (13,8%).

L. monocytogenes este o bacterie ubicuitară, fiind prezentă în sol, ape, materii vegetale și ferme de animale, astfel că pătrundere acesteia, prin intermediul materiilor prime, în mediul de procesare a alimentelor este aproape inevitabilă. Având o capacitate de adaptare și supraviețuire remarcabilă, bacteria poate persista perioade lungi de timp în fabricile de produse alimentare, în ciuda unor proceduri regulate de igienizare și dezinfecție. Tulpinile de *L. monocytogenes* persistente constituie un risc continuu de contaminare a produselor alimentare, aceasta putând avea loc, în special, în cadrul etapelor de manipulare post-procesare. Spre deosebire de multe alte bacterii patogene asporulate, *L. monocytogenes* prezintă capacitatea de a prolifera în produsele alimentare cu umiditate relativ scăzută, pH acid, conținut de sare ridicat și în cele depozitate la temperaturi de refrigerare, controlul acesteia prin metode de procesare tradiționale fiind, prin urmare, dificil. Prin urmare, cercetătorii și specialiștii din industria alimentară au acordat, în ultimul timp, o atenție deosebită acestui patogen, încercând să înțeleagă factorii genetici și mecanismele moleculare care stau la baza abilității lui de a depăși obstacolele impuse de strategiile de conservare aplicate la nivel industrial.

Noile obiceiuri ale consumatorilor și preferința acestora în creștere pentru produse alimentare minim procesate, cu proprietăți senzoriale și nutriționale superioare, au indus necesitatea implementării în industrie a unor metode de procesare alternative, în cadrul cărora este inclusă și procesarea la presiuni înalte (HPP). HPP este o metodă de procesare alternativă la tratamentele termice, capabilă să inactiveze majoritatea bacteriilor de alterare și patogene, cu un impact minim asupra majorității grupelor de alimente. Cu toate acestea, succesul metodei pare să fie limitat, din moment ce unele bacterii, precum *L. monocytogenes*, reușesc să reziste sau să se refacă după tratament. Nu puține sunt studiile care au raportat recuperarea celulelor de *L. monocytogenes* și proliferarea lor în produsele alimentare depozitate în condiții de refrigerare, după tratarea acestora la presiuni înalte, chiar și în cazul regimului de lucru practicat în industrie (tratamente la 600 MPa). Tehnicile imagistice avansate au permis studiul modului în care HPP afectează celulele listeriale, evidențiind leziunile la nivelul învelișului celular drept unul dintre efectele principale ale tratamentului. Totodată, analizele transcriptomice ale celulelor de *L. monocytogenes* tratate la presiuni înalte au raportat expresia crescută a genelor asociate cu biosinteza peretelui celular și funcțiile membranei celulare.

Corelând aceste aspecte, obiectivul principal al tezei de doctorat a fost reprezentat de punerea în evidență a unor mecanisme moleculare implicate în rezistența *L. monocytogenes* la

presiuni înalte. Prezenta cercetare și-a propus, astfel, eliminarea a două gene din genomul *L. monocytogenes* EGDe (tulpină model), *Imo1013* și *Imo2999*, cu posibilă importanță pentru capacitatea bacteriei de a supraviețui și/sau recupera în urma tratamentului la presiuni înalte. Gena *Imo1013* codifică canalele ionice mecanosenzitive de conductanță mică din membrana celulară, responsabile, într-o bună măsură, cu menținerea integrității acesteia sub efectul unei tensiuni extreme, fiind asumat un potențial rol al acestora în răspunsul *L. monocytogenes* la HPP. Dat fiind faptul că HPP exercită un stres mecanic la nivelul peretelui celular, deteriorându-l, și că mai multe studii au raportat supraexprimarea genelor implicate în procesul de biosinteză a peptidoglicanului după tratament, s-a decis eliminarea genei *Imo2229*, care codifică proteina de legare a penicilinei A2. Această enzimă prezintă activitate transglicozilazică și transpeptidazică, participând la formarea lanțului glicanic și realizând, totodată, legăturile încrucișate dintre lanțurile peptidice laterale. Prin urmare, funcția acestei proteine poate avea o importanță majoră în ceea ce privește abilitatea celulelor de *L. monocytogenes* de a repara leziunile survenite la nivelul peretelui celular, ca urmare a unui stres de natură fizică, precum HPP.

Pornind de la obiectivul major al tezei, au derivat următoarele obiective științifice cheie:

- Construcția tulpinilor mutante, *L. monocytogenes* EGDe Δ *Imo1013* și *L. monocytogenes* EGDe Δ *Imo2229*, prin deleția, din genom, a genelor țintă amintite anterior, *Imo1013*, respectiv *Imo2229*;
- Caracterizarea fenotipică a tulpinilor modificate genetic, în raport cu tulpina sălbatică, pentru o bună înțelegere a comportamentului acestora;
- Evaluarea rezistenței tulpinilor nou obținute, comparativ cu tulpina sălbatică, la tratamentul la presiuni înalte în scopul determinării rolului pe care îl au proteinele codificate de genele eliminate în rezistența bacteriei la presiuni înalte;
- Evaluarea susceptibilității tulpinilor de *L. monocytogenes* mutante la alte tipuri de stres pe care bacteria le poate întâlni în matricea alimentară;
- Selecția unei tulpini de *L. monocytogenes* cu barotoleranță ridicată, prin testarea rezistenței la presiuni înalte a unor izolate din alimente sau mediul de procesare a acestora;
- Propunerea unei alternative la tratamentul la presiune înaltă aplicat de industrie (600 MPa, 3 min), prin aplicarea tehnologiei obstacolelor, în vederea obținerii unui produs din carne sigur pentru consum, dar și a diminuării costurilor asociate procesului tehnologic;
- Dezvoltarea unui model predictiv, cu ajutorul căruia să poată fi estimată probabilitatea de recuperare a *L. monocytogenes* după tratamentul la presiune înaltă, cu sau fără nizină, pe durata depozitării produsului alimentar în condiții de refrigerare.

Structura tezei de doctorat

Prezenta teză de doctorat conține șase capitole și concluziile finale cu privire la rezultatele cercetării. Teza include 38 de figuri și 32 de tabele.

Prima parte a capitolului I, intitulat „Implicații ale bacteriei patogene *Listeria monocytogenes* privind siguranța alimentară”, prezintă o sinteză a informațiilor oferite de literatura de specialitate recentă cu privire la bacteria patogenă *L. monocytogenes*. Sunt discutate aspecte cu referire la taxonomie, istoric, principalele caracteristici fenotipice, serotipuri asociate cu listerioza, patogenicitatea și virulența bacteriei, problemele generate de prezența *L. monocytogenes* în mediul de procesare a alimentelor, epidemii de listerioză recente din spațiul european și urmările acestora asupra consumatorilor și a procesatorilor de alimente, precum și politicile adoptate de diverse țări cu privire la reducerea incidenței *L. monocytogenes* în alimente.

Partea a doua documentează mecanismele utilizate de bacteria patogenă *L. monocytogenes* pentru a supraviețui și prolifera în produsele alimentare, în ciuda obstacolelor impuse de industrie prin conservarea acestora. Sunt discutate mecanismele aplicate de bacterie pentru a rezista la factori de stres asociați metodelor de conservare convenționale, precum temperaturile înalte și scăzute, aciditatea, stresul osmotic și prezența bacteriocinelor. De asemenea, sunt sintetizate informațiile din literatura de specialitate cu privire la rezistența *L. monocytogenes* la tehnologii moderne de producere și conservare a alimentelor (procesare la presiuni înalte, procesare cu lumină UV, procesarea cu ajutorul câmpurilor electrice pulsatorii), care generează noi factori de stres, precum și la condiții de stres întâlnite în mediul de procesare a alimentelor (stresul oxidativ). Studiul contribuie, prin complexitatea lui, la o înțelegere aprofundată a rezistenței *L. monocytogenes*, propunându-și să ajute speciliștii din industria alimentară în proiectarea unor metode de procesare eficiente în combaterea acestui patogen, spre a oferi o mai bună protecție consumatorilor.

Capitolul II, intitulat „Materiale și echipamente” prezintă descrierea detaliată a materialelor și echipamentelor utilizate în cadrul studiilor experimentale. Sunt prezentate, în detaliu, informații cu privire la tulpini bacteriene, vectori plasmidiali, medii de cultură a bacteriilor, reactivi de laborator (antibiotice, kit-uri de analiză pentru biologie moleculară, soluții tampon, enzime, oligonucleotide, substanțe chimice), softwear-uri, baze de date accesate, echipamente și aparatură de laborator.

Capitolele III-VI sunt organizate conform articolelor științifice, conținând următoarele secțiuni: introducere, materiale și metode, rezultate și discuții ale acestora prin comparație cu literatura de specialitate și concluzii.

Capitolul III, intitulat „Construcția tulpinilor mutante *Listeria monocytogenes* EGDe Δ Imo1013 și *Listeria monocytogenes* EGDe Δ Imo2229”, prezintă construcția tulpinilor mutante *L. monocytogenes* EGDe Δ Imo1013 și *L. monocytogenes* EGDe Δ Imo2229. Metoda privind deleția situs-direcționată a genelor țintă, *Imo1013* și *Imo2229*, a avut la bază sistemul lactococic format vectorii plasmidiali *pORI280* și *pVE6007*. Strategia aplicată, descrisă pas cu pas, poate constitui un ghid pentru comunitatea de cercetători care studiază rezistența *L. monocytogenes* la diferiți factori de stres.

Capitolul IV, cu titlul „Caracterizarea fenotipică a tulpinilor mutante construite, *Listeria monocytogenes* EGDe Δ Imo1013 și *Listeria monocytogenes* EGDe Δ Imo2229”, realizează caracterizarea fenotipică a tulpinilor mutante de *L. monocytogenes* construite, în raport cu tulpina sălbatică, urmărind determinarea capacității acestora de creștere prin cultivare în sistem submers discontinuu, caracterizarea morfologică a celulelor mutante, evaluarea motilității mutantilor, precum și a capacității lor de a forma biofilm pe suprafețe hidrofobe (polistiren). Mutațiile induse au modificat comportamentul bacteriei privind dinamica de creștere, morfologia și motilitatea. Cercetarea poate constitui un punct de referință pentru studiul rolului genelor omoloage în alte bacterii patogene.

Capitolul V, al cărui denumire este „Rezistența tulpinilor mutante, *L. monocytogenes* EGDe Δ Imo1013 și *L. monocytogenes* Δ Imo2229, la presiune înaltă și alți factori de stres asociați cu produsele alimentare”, evidențiază, pentru prima dată, rolul proteinelor eliminate ca urmare a deleției genelor țintă, *Imo1013* și *Imo2229*, în rezistența *L. monocytogenes* la presiuni înalte. S-a arătat că tulpina mutantă *L. monocytogenes* EGDe Δ Imo1013, deficientă în canalele ionice mecanosensitive de conductanță mică, se comportă similar cu tulpina sălbatică la tratamentul cu presiuni înalte, ceea ce sugerează că gena codificatoare nu contribuie la rezistența bacteriei la acest stres. Pe de altă parte, tulpina mutantă *L. monocytogenes* EGDe Δ Imo2229, deficientă în proteina de legare a penicilinei A2, s-a dovedit a fi semnificativ mai sensibilă decât tulpina sălbatică la acțiunea presiunilor înalte, evidențiindu-se, astfel, un posibil mecanism molecular care contribuie la recuperarea celulelor de *L. monocytogenes* lezate. Capitolul analizează, de asemenea, rolul proteinelor studiate în rezistența *L. monocytogenes* la alte tipuri de stres asociate cu matricea alimentară, precum stresul osmotic (stres hiper- și hipoosmotic) și prezența nazinei (bacteriocină aprobată ca bio-conservant). Cercetările au indicat că proteina de legare a penicilinei A2 contribuie la rezistența bacteriei la concentrații mari de sare (NaCl) și nizină.

Capitolul VI, denumit „Evaluarea efectului combinat al procesării la presiuni înalte și nizină asupra capacității *Listeriei monocytogenes* de a supraviețui pe șuncă gata pentru consum”, simulează contaminarea unui produs din carne gata pentru consum (șuncă de Praga) cu o tulpină de *L. monocytogenes* cu barotoleranță ridicată (RO15), selectată, pe baza rezistenței la presiune înaltă, dintr-o colecție de tulpini izolate fie din produse alimentare, fie din mediul de procesare a acestora. În urma aplicării unor variante diferite de tratament, studiul propune combinarea HPP, la o intensitate mai scăzută (500 MPa, 8°C, 3 min), cu adaosul de nizină (25 mg/kg), drept alternativă la tratamentul produselor din carne practicat în industrie (600 MPa, 8°C, 3 min), în vederea reducerii costurilor asociate cu procesul tehnologic, dar și a obținerii unui produs alimentar sigur pentru consum. De asemenea, a fost dezvoltat un model predictiv, bazat pe regresie logistică, în vederea estimării probabilității de recuperare a *L. monocytogenes* după tratamentul produsului din carne la HPP, în prezența sau absența nazinei.

Concluziile finale, prezentate în capitolul VII, oferă o imagine de ansamblu asupra rezultatelor cercetării experimentale din prezenta teză de doctorat. Sunt indicate contribuțiile originale ale autoarei la dezvoltarea cunoașterii în domeniul abordat, precum și perspective de continuare a cercetării. În cele din urmă, este prezentată diseminarea rezultatelor obținute pe durata studiilor doctorale.

Studiile experimentale din cadrul tezei de doctorat au fost desfășurate în laboratoarele:

- Laboratorul de Analize Fizico-Chimice și Microbiologice pentru Alimente (LAFDMA), aparținând Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor, din cadrul Universității “Dunărea de Jos” din Galați;
- Laboratorul de Genetică, aparținând Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor, din cadrul Universității “Dunărea de Jos” din Galați.

Cercetarea a fost sprijinită financiar de următoarele proiecte:

- Proiectul SafeFood – Development of a novel industrial process for safe, sustainable and higher quality foods, using biotechnology and cybernetic approach (ERA-IB-16-014).
- Fondul Social European prin Programul Operațional Sectorial Capital Uman 2014-2020 prin Acordul financiar: „Burse pentru educația antreprenorială în rândul doctoranzilor și cercetătorilor postdoctorat (Be Antreprenor!)”, Contract Nr. 51680/09.07.2019; cod SMIS: 124539.

CAPITOLUL I

Implicații ale bacteriei patogene *Listeria monocytogenes* privind siguranța alimentelor

Rezistența *L. monocytogenes* la presiuni înalte

Procesarea la presiuni înalte (*engl.* HPP) este o tehnologie alternativă la procesarea termică a alimentelor, fiind utilizată cu scopul de a distruge microorganismele de alterare și patogenii de origine alimentară (Huang *et al.*, 2014). În funcție de matricea alimentară și microorganismul țintă, valoarea presiunii la care se realizează tratamentele variază, de regulă, între 250 și 700 MPa. Celulele bacteriene supuse tratamentului la presiuni înalte suferă modificări morfologice și fiziologice, care pot fi reversibile sau nu în funcție de presiunea aplicată și timpul de menținere a acesteia. Efectele principale cauzate de HPP constă în creșterea permeabilității membranei celulare, denaturarea structurii proteinelor și, în consecință, inhibarea funcțiilor metabolice, a replicării și a transcrierii (Huang *et al.*, 2014; Figura 1.1).

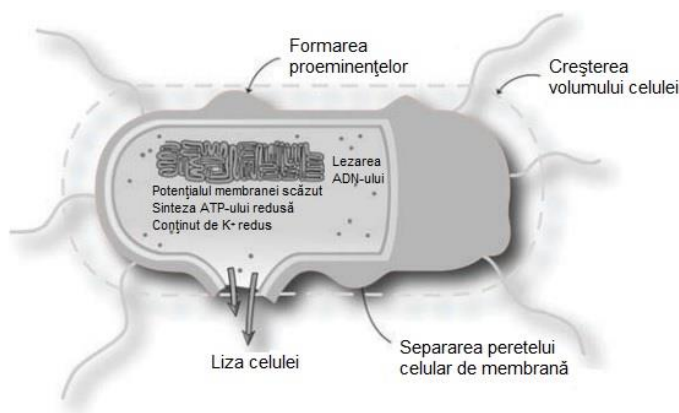


Figura 1.1. Efectul presiunii înalte asupra celulei listeriale (Ferreira *et al.*, 2016)

Efectul presiunilor înalte asupra *L. monocytogenes* a fost investigat la nivel transcriptomic global prin analiză *microarray*, urmată de tehnica RT-PCR, în scopul evidențierii genelor implicate în toleranța la acest tip de stres (Bowman *et al.*, 2008). Studiul a indicat că nivelurile de ARN mesager (mRNA) au fost reduse global odată cu creșterea intensității și a duratei tratamentului. Mai mult, HPP a indus expresia genelor asociate cu repararea ADN-ului, transcriere, translație, diviziune celulară, secreția proteinelor extracelulare, motilitate și biosinteza membranei și a peretelui celular. Pe de altă parte, a fost observată reducerea expresiei genelor implicate în acumularea de carbohidrați, metabolismul energetic și virulență. În mod surprinzător, efectul HPP pare să reducă expresia factorului sigma SigB, implicat în răspunsul la stresul general, și a unei părți din regulonul SigB. Una dintre genele care au indicat o expresie crescută, ca urmare a tratamentului la presiuni înalte, a fost gena *cspL* care codifică o proteină cold-shock. Acest fenomen sugerează că HPP poate induce, de asemenea, rezistență încrucișată la alte tipuri de stres. De exemplu, rezistența celulelor de *L. monocytogenes* la HPP a fost mai mare în lapte semi-degresat decât în soluție tampon, iar celulele rezistente izolate s-au dovedit a fi mai tolerante la căldură, aciditate și stres oxidativ (Karatzas și Bennik, 2002).

Mutațiile represorului CtsR au fost asociate cu rezistența spontană a celulelor de *L. monocytogenes* la HPP. Mutanții cu rezistență stabilă au indicat inserții sau deleții de nucleotide la nivelul genei *ctsR*, care afectează în mod negativ activitatea represorului codificat. Pierderea funcției represorului CtsR a fost acompaniată de creșterea expresiei genelor *clpB*, *clpC*, *clpE* și *clpP* (Karatzas *et al.*, 2003; van Boeijen *et al.*, 2010). Proteazele Clp au un rol bine definit în degradarea proteinelor denaturate, prevenind acumularea acestora cu potențial dăunător în celulele bacteriene (Krüger *et al.*, 2000; Tomoyasu *et al.*, 2001). Din moment ce unul dintre principalele efecte ale HPP se rezumă la denaturarea proteinelor (Moreirinha *et al.*, 2016), creșterea activității protazelor Clp poate fi o cauză directă a toleranței *L. monocytogenes* la HPP. Totuși, în urma izolării mutanților rezistenți, care nu prezintă această mutație, s-a conturat ideea că există mecanisme încă necunoscute, care joacă un rol major în rezistența *L. monocytogenes* la HPP (Karatzas *et al.*, 2005). Mai mult, Chen *et al.* (2009) au raportat că diferitele niveluri de rezistență a celulelor de *L. monocytogenes* la HPP nu sunt bazate pe mutațiile la nivelul genei *ctsR*.

Celulele de *L. monocytogenes* Scott A și un izolat cu rezistență spontană la HPP s-au dovedit a fi mai rezistente la acest tip de tratament în fază staționară de creștere, spre deosebire de cele aflate în fază logaritmică de creștere (Karatzas și Bennik, 2002). În plus, se pare că celulele bacteriene aflate în fază de creștere staționară nu manifestă cel mai ridicat nivel de rezistență la acțiunea HPP. Celulele de *L. monocytogenes* în faza de supraviețuire pe termen lung au indicat o rezistență și mai crescută, din moment ce tranziția către fazele de creștere exponențială și staționară a rezultat într-un număr mai mic de supraviețuitori în urma tratamentului la presiuni înalte. Acest fenomen a fost atribuit modificării morfologiei celulare de la bacilli la coci, care a rezultat în comprimarea citoplasmei și, implicit, în reducerea activității apei intracelulare (Wen *et al.*, 2009).

CAPITOLUL II

Materiale și echipamente

Materialele și echipamentele utilizate în prezenta teză de doctorat au fost puse la dispoziția autoarei de către Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați și Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, Universitatea din Ulm, Germania.

Tulpini bacteriene și vectori plasmidiali

Tulpinile bacteriene și vectorii plasmidiali utilizați în studiile experimentale sunt prezentați în **Tabelul 2.1**, respectiv **Tabelul 2.2**.

Tabelul 2.1. Tulpini bacteriene utilizate în studiile experimentale

Tulpini bacteriene	Descriere	Sursa
Tulpini de <i>Escherichia coli</i>		
EC10B	Derivat al tulpinii de clonare <i>E. coli</i> DH10B, cu gena <i>repA</i> și cea de rezistență la kanamicină (Kan ^r) integrate în gena <i>glgB</i>	Monk <i>et al.</i> , (2008)
EC10B/pORI280(AD) Δ <i>Imo1013</i>	<i>E. coli</i> EC10B transformată cu vectorul	Studiul acesta

Tulpini bacteriene	Descriere	Sursa
	recombinat <i>pORI280(AD)ΔImo1013</i>	
EC10B/ <i>pORI280(AD)ΔImo2229</i>	<i>E. coli</i> EC10B transformată cu vectorul recombinat <i>pORI280(AD)ΔImo2229</i>	Studiul acesta
Tulpini de <i>Listeria monocytogenes</i>		
EGDe	Tulpină sălbatică, serotip 1/2a	Glaser <i>et al.</i> , (2001)
EGDe <i>ΔImo1013</i>	<i>L. monocytogenes</i> EGDe modificată genetic prin deleția genei <i>Imo1013</i>	Studiul acesta
EGDe <i>ΔImo2229</i>	<i>L. monocytogenes</i> EGDe modificată genetic prin deleția genei <i>Imo2229</i>	Studiul acesta
AB100	Tulpină izolată din produs alimentar, serotip 1/2a (3a)	-
AB120	Tulpină izolată din mediul de procesare a alimentelor, serotip 1/2a (3a)	-
AB199	Tulpină izolată din mediul de procesare a alimentelor, serotip 1/2a (3a)	-
AB204	Tulpină izolată din mediul de procesare a alimentelor, serotip 1/2a (3a)	-
AB24	Tulpină izolată din mediul de procesare a alimentelor, serotip 1/2a (3a)	-
AB80	Tulpină izolată din produs alimentar, serotip 1/2a (3a)	-
ABS43	Tulpină izolată din produs alimentar, serotip 1/2c (3c)	-
ABS45	Tulpină izolată din mediul de procesare a alimentelor, serotip 1/2c (3c)	-
RO15	Tulpină izolată din produs alimentar, serotip 4b (4d, 4e)	Ciolacu <i>et al.</i> (2015)
RO4	Tulpină izolată din produs alimentar, serotip 1/2a (3a)	Ciolacu <i>et al.</i> (2015)

Tabelul 2.2. Vectori plasmidiali utilizați în studiile experimentale

Vectori plasmidiali	Descriere	Sursa
<i>pORI280</i>	Vector de integrare RepA ⁻ , <i>lacZ</i> constitutiv; Ori (originea de replicare din plasmidul lactococic <i>pWV01</i>); Em ^r (gena de rezistență la eritromicină)	Leenhouts <i>et al.</i> , (1996)
<i>pORI280(AD)ΔImo1013</i>	Vectorul plasmidial <i>pORI280</i> care conține fragmentele ADN de flancare, AB (fragmentul stâng incluzând codonul start ATG) și CD (fragmentul drept incluzând codonul stop TAA), ale genei <i>Imo1013</i>	Studiul acesta
<i>pORI280(AD)ΔImo2229</i>	Vectorul plasmidial <i>pORI280</i> care conține fragmentele ADN de flancare, AB (fragmentul stâng incluzând codonul start ATG) și CD (fragmentul drept incluzând codonul stop TAA), ale genei <i>Imo2229</i>	Studiul acesta
<i>pVE6007</i>	Vector ajutător termosensibil (< 30 °C), RepA ⁺ , Cm ^r (gena de rezistență la cloramfenicol)	Maguin <i>et al.</i> , (1992)

CAPITOLUL III

Construcția tulpinilor mutante, *Listeria monocytogenes* EGDe Δ *Imo1013* și *Listeria monocytogenes* EGDe Δ *Imo2229*

Scopul acestui capitol a fost reprezentat de construcția tulpinilor mutante, *L. monocytogenes* EGDe Δ *Imo1013* și *L. monocytogenes* Δ *Imo2229*, pentru punerea în evidență a unor mecanisme posibil utilizate de bacterie în rezistența la presiuni înalte. Deleția genelor țintă, *Imo1013* și *Imo2229*, din genomul *L. monocytogenes* EGDe, a avut loc printr-un proces de recombinare homoloagă în două etape, pentru care s-a utilizat sistemul lactococic compus din vectorul plasmidial de integrare *pORI280* (RepA⁻), care permite clonarea fragmentelor ADN de interes, și vectorul plasmidial *pVE6007* (RepA⁺; termosensibil), care asigură replicarea vectorului de integrare în organismul gazdă. Gena *Imo1013* codifică canalele ionice mecanosensibile de conductanță mică, responsabile pentru menținerea integrității membranei celulare sub efectul unei tensiuni extreme. Gena *Imo2229* codifică proteina de legare a penicilinei A2, care participă la biosinteza peptidoglicanului, principalul component al peretelui celular Gram pozitiv.

Rezultate și discuții

Strategia de deleție a genelor țintă, *Imo1013*, respectiv *Imo2229*, a constat în generarea fragmentelor de ADN flancatoare, AB (fragmentul stâng incluzând codonul start, ATG) și CD (fragmentul drept incluzând codonul stop, TAA), ligarea acestora în vectorul de integrare *pORI280* și transformarea celulelor listeriale cu vectorul recombinat, în prezența proteinei RepA furnizate în *trans* de un vector ajutător, pentru inducerea recombinării homoloage la nivelul cromozomului gazdă.

Lungimea preconizată a secvențelor de flancare AB și CD, amplificate din ADN-ul genomic extras din celulele de *L. monocytogenes* EGDe, a fost de 543 pb. Amplificarea fragmentelor s-a realizat folosindu-se primeri de tip Gibson, configurați astfel încât ampliconii să prezinte capete de suprapunere complementare cu capetele vectorului *pORI280* liniarizat cu enzima de restricție *Pst*I (20 pb), celelalte capete (20 pb) fiind create în scopul hibridizării lor, cu formarea fragmentului AD (**Figura 3.1. A**). După cum se poate observa în **Figura 3.1. B**, lungimea fragmentelor amplificate, AB și CD, a corespuns celei preconizate, de 543 pb.

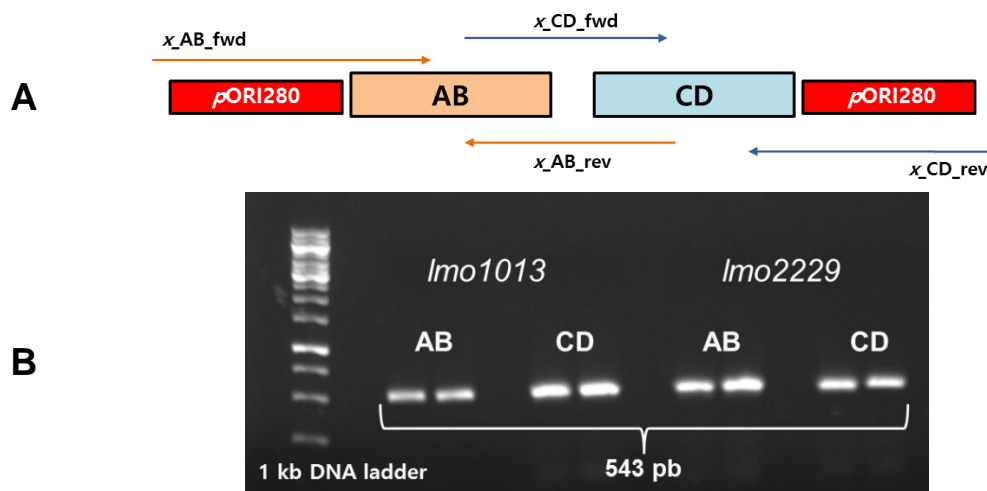


Figura 3.1. A. Ilustrarea schematică a amplificării fragmentelor ADN de flancare a genelor țintă, utilizându-se primeri Gibson B. Separarea în gel de agaroză 1% a fragmentelor ADN de flancare, AB și CD (543 pb), situate în aval, respectiv amonte, față de genele de interes, *Imo1013* și *Imo2229*

Ligarea fragmentelor ADN de flancare în vectorul de integrare *pORI280*, la nivelul situsului *PstI*, a fost realizată prin asamblare Gibson, rezultând vectorii recombinanți denumiți în continuare *pORI280(AD)* [*pORI280(AD)ΔImo1013* și *pORI280(AD)ΔImo2229*].

După transformarea celulelor de *E. coli* EC10B, pentru identificarea clonelor care poartă vectorii recombinanți *pORI280(AD)*, s-a procedat la amplificarea fragmentului AD (1.046 pb) prin Colony PCR. În acest sens, pentru depistarea fiecărui vector recombinat în parte, au fost testați, în medie, câte 50 de transformanți, fiind identificate 7 clone care poartă vectorul recombinat *pORI280(AD)ΔImo1013* și 6 clone care poartă vectorul recombinat *pORI280(AD)ΔImo2229* (Figura 3.2).

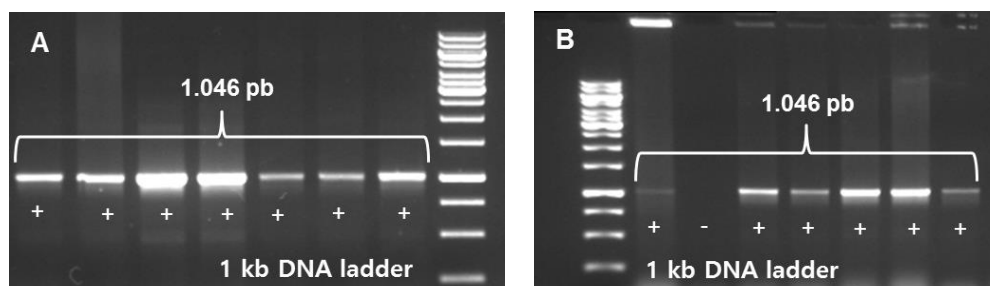


Figura 3.2. Separarea în gel de agaroză 1% a fragmentelor AD (1.046 pb), amplificate prin Colony PCR din transformanții *E. coli* EC10B, în vederea identificării clonelor pozitive. A. Identificarea clonelor care poartă vectorul recombinat *pORI280(AD)ΔImo1013*. B. Identificarea clonelor care poartă vectorul recombinat *pORI280(AD)ΔImo2229*

În continuare, după izolarea vectorilor recombinanți *pORI280(AD)* din clonele de *E. coli* EC10B purtătoare, pentru confirmarea inserării corecte a fragmentului AD, s-a produs digestia enzimatică a acestora cu endonucleazele de restricție *BglII* și *NotI*. În vectorii recombinanți, situsurile de restricție specifice endonucleazelor de restricție *BglII* și *NotI* se regăsesc în aval, respectiv amonte, față de situs-ul în care taie endonucleaza *PstI*, la nivelul căruia s-a realizat ligarea secvențelor AB și CD, la o distanță de 53, respectiv 38 pb (Figura 3.3. A). Prin urmare,

Construcția a două tulpini mutante de *Listeria monocytogenes* în vederea evidențierii mecanismului de rezistență a bacteriei la presiuni înalte și caracterizarea acestora

cele două fragmente de ADN rezultate prin digestia vectorilor recombinanți *pORI280(AD)* au fost preconizate ca având o lungime de 5.145, respectiv 1.097 pb, lucru confirmat în urma migrării electroforetice a produșilor de digestie și a vizualizării acestora pe transiluminator (**Figura 3.3. B**).

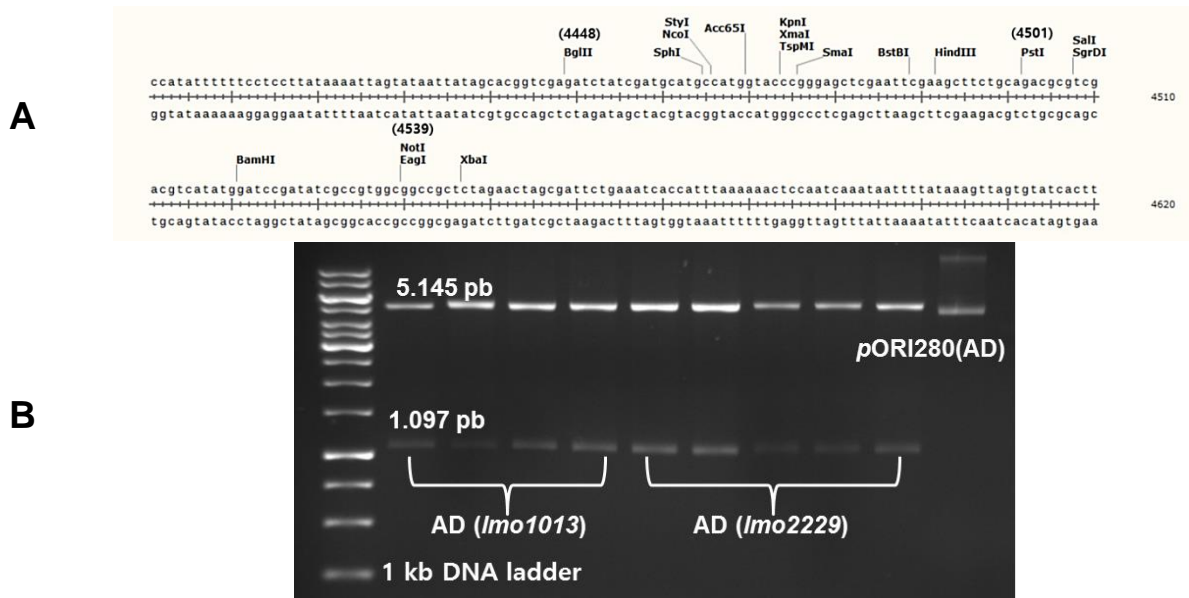


Figura 3.3. A. Situsul multiplu de clonare din vectorul *pORI280*, situsurile de restricție indicate fiind unice. **B.** Separarea în gel de agaroză 1% a fragmentelor de ADN rezultate în urma digestiei vectorilor recombinanți *pORI280(AD)*, izolați din clonele *E. coli* EC10B pozitive, cu endonucleazele de restricție *Bgl*II și *Not*I; *pORI280(AD)* reprezintă controlul negativ

Celulele de *L. monocytogene* EGDe au fost transformate prin electroporare cu vectorul recombinat *pORI280(AD)ΔImo1013*, respectiv *pORI280(AD)ΔImo2229*, și vectorul ajutător *pVE6007 RepA⁺*, care asigură replicarea celor din urmă la o temperatură permisivă (< 30°C). Prin incubarea transformanților la temperatura de 37°C, a fost indusă inactivarea proteinei termosensibile RepA, rezultând pierderea vectorului *pVE6007*. Astfel, a fost forțată integrarea vectorului recombinat, în cromozomul celulelor gazdă, prin intermediul unuia dintre fragmentele de flancare a genelor țintă, AB sau CD (Landete, 2016; **Figura 3.9**). Pierderea vectorului ajutător *pVE6007* a fost confirmată prin cultivarea celulelor de *L. monocytogenes* EGDe transformate pe mediu de cultură suplimentat cu cloramfenicol, întrucât vectorul în cauză include gena care conferă bacteriilor rezistență la acest antibiotic. Clonele sensibile la cloramfenicol au fost selectate și cultivate static la temperatura de 37°C, în mediu de cultură fără eritromicină. La intervale de 24 de ore, culturile au fost repicate, ocazie cu care celulele au fost inoculate pe mediu de cultură suplimentat cu substratul cromogen X-Gal, în vederea realizării selecției alb-albastre.

După 10 repicări consecutive, în urma cultivării celulelor pe mediu de cultură cu X-Gal, s-au dezvoltat colonii albe la o frecvență de aproximativ 5% (**Figura 3.4. A**), indicând cea de-a doua etapă de recombinare. În această etapă, are loc excizia vectorului *pORI280* din cromozomul bacterian, fiind îndepărtate, în consecință, gena *lacZ*, gena de rezistență la eritromicină și originea de replicare *Ori*. Astfel, coloniile dezvoltate de celulele în care s-a produs acest fenomen devin albe atunci când sunt cultivate pe mediu de cultură cu X-Gal, în lipsa β-

galactozidazei care catalizează hidroliza acestuia. Coloniile recombinante albe au fost striate pe un *master-plate* (Figura 3.4. B), testate pe mediu de cultură selectiv ALOA în vederea determinării purității acestora (Figura 3.4. C), caz în care s-a urmărit dezvoltarea unei biomase tipice de culoare verde-albastră înconjurată de halou opac, și striate pe mediu de cultură cu eritromicină pentru testarea rezistenței la acest antibiotic. Pentru identificarea mutanților, clonele pure, care au indicat sensibilitate la eritromicină (Figura 3.4. D), au fost testate prin tehnica Colony PCR, în comparație cu tulpina sălbatică *L. monocytogenes* EGDe. Strategia a constat în amplificarea regiunii genomice care include atât secvențele ADN de flancare, AB și CD, cât și gena de interes (Figura 3.5).

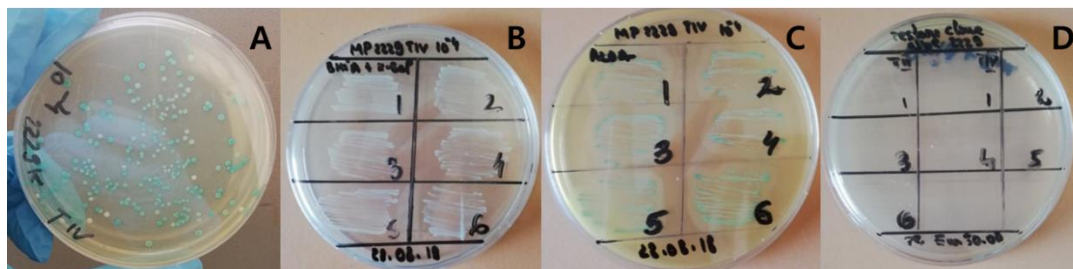


Figura 3.4. Clone de *L. monocytogenes* EGDe recombinante. **A.** Dezvoltarea coloniilor recombinante albe de *L. monocytogenes* EGDe pe mediu de cultură cu X-Gal. **B.** *Master-plate* conținând colonii recombinante albe de *L. monocytogenes* EGDe. **C.** Testarea coloniilor recombinante albe de *L. monocytogenes* EGDe pe mediu de cultură selectiv ALOA în vederea determinării purității. **D.** Testarea coloniilor recombinante albe de *L. monocytogenes* EGDe în vederea susceptibilității la eritromicină

Diferențierea clonelor mutante de cele de tip sălbatic s-a realizat prin analiza lungimii fragmentelor de ADN amplificate prin Colony PCR. Secvențele genelor țintă, *Imo1013* și *Imo2229*, includ 846, respectiv 2.145 nt. Prin urmare, ampliconii cu lungimea de 1.046 pb corespund clonelor mutante cu gena de interes deletată, în timp ce ampliconii cu lungime de 1.886, respectiv 3.185 pb, corespund clonelor de tip sălbatic.

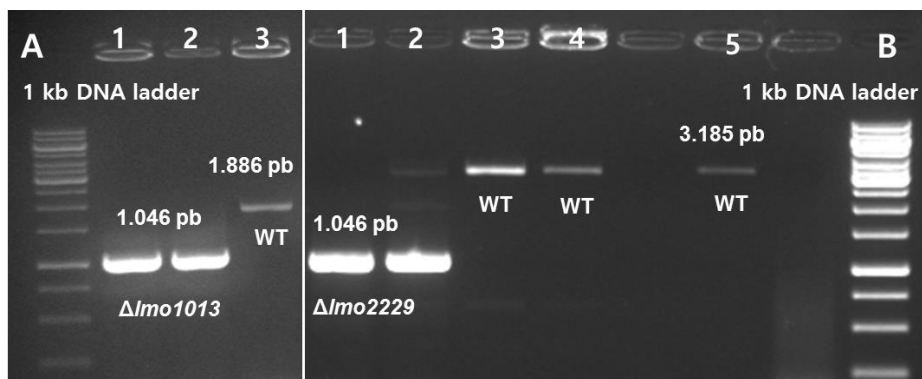


Figura 3.5. Separarea în gel de agaroză 1% a fragmentelor AD amplificate prin Colony PCR din clonele recombinante de *L. monocytogenes* EGDe. **A.** 1, 2 – ampliconi cu lungimea de 1.046 pb, indicând clonele mutante $\Delta Imo1013$; 3 – amplicon cu lungimea de 1.886 pb, indicând tulpina sălbatică (*L. monocytogenes* EGDe). **B.** 1, 2 – ampliconi cu lungimea de 1.046 pb, indicând clonele mutante $\Delta Imo2229$; 3, 4, 5 – ampliconi cu lungimea de 3.185 pb, unde 3 și 4 indică clone de tip sălbatic și 5 indică tulpina sălbatică (*L. monocytogenes* EGDe)

Construcția a două tulpini mutante de *Listeria monocytogenes* în vederea evidențierii mecanismului de rezistență a bacteriei la presiuni înalte și caracterizarea acestora

Pentru confirmare deleției genelor țintă, *Imo1013*, respectiv *Imo2229*, din genomul *L. monocytogenes* EGDe, s-a izolat ADN-ul genomic din tulpinile modificate genetic și tulpina sălbatică, probele fiind trimise spre secvențiere genică la Institutul de Biotehnologie, Universitatea din Helsinki. Ca tehnologie de secvențiere a ADN-ului genomic, a fost aplicată secvențierea de nouă generație (*engl.* Next Generation Sequencing; NGS; **Figurile 3.6 și 3.7**).

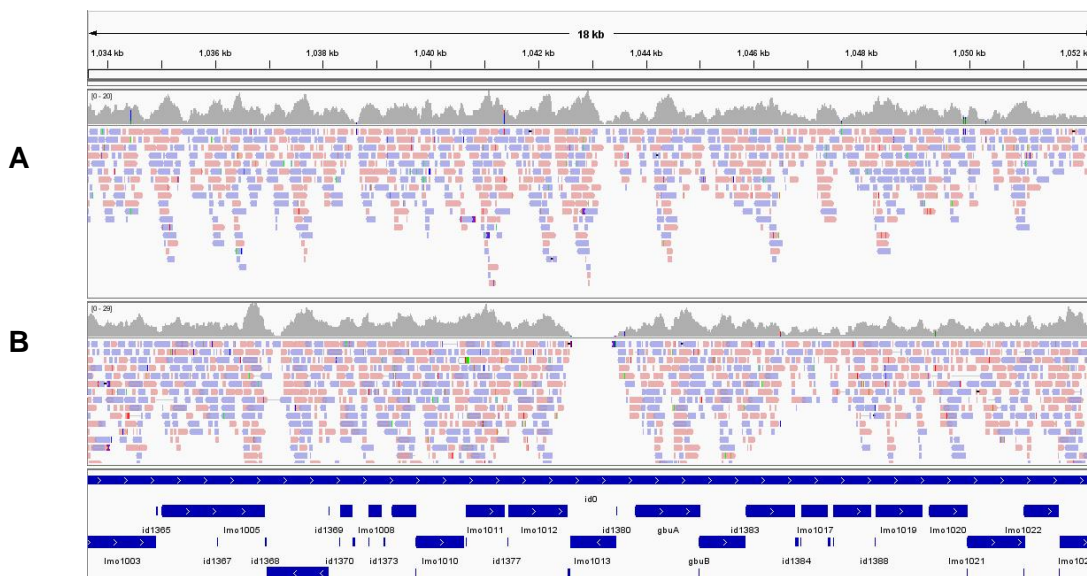


Figura 3.6. Confirmarea deleției genei *Imo1013* din genomul *L. monocytogenes* EGDe prin NGS (vizualizată cu programul Integrative Genomics Viewer). **A.** Încadrarea genei *Imo1013* în regiunea ~ 1.042 – 1.043 kpb din genomul *L. monocytogenes* EGDe **B.** Evidențierea deleției genei *Imo1013* din genomul *L. monocytogenes* EGDe

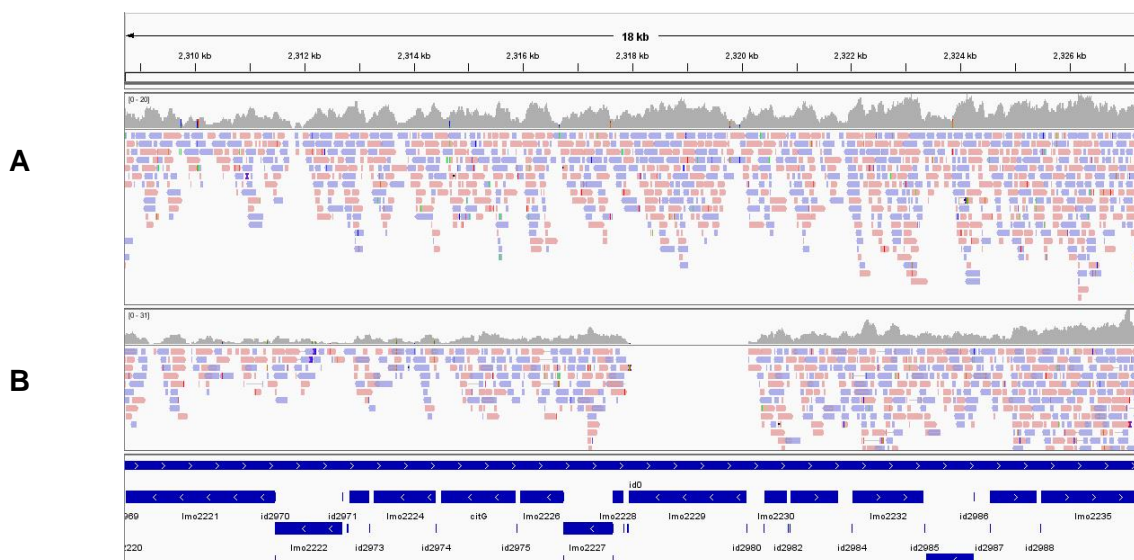


Figura 3.7. Confirmarea deleției genei *Imo2229* din genomul *L. monocytogenes* EGDe prin NGS (vizualizată cu programul Integrative Genomics Viewer). **A.** Încadrarea genei *Imo2229* în regiunea ~ 2.318 – 2.320 kpb din genomul *L. monocytogenes* EGDe **B.** Evidențierea deleției genei *Imo2229* din genomul *L. monocytogenes* EGDe

Concluzii

Acest capitol prezintă construcția tulpinilor mutante, *L. monocytogenes* EGDe $\Delta Imo1013$ și *L. monocytogenes* EGDe $\Delta Imo2229$, prin deleția genelor *Imo1013*, respectiv *Imo2229*, din genomul *L. monocytogenes* EGDe. Metoda de deleție, având la bază sistemul lactococic format din vectorii plasmidiali *pORI280* și *pVE6007*, a constat în șapte etape cheie, care au fost parcurse cu succes:

- Amplificarea fragmentelor de flancare a genelor țintă, AB și CD, utilizându-se primerii configurați în vederea asamblării acestora cu vectorul *pORI280* liniarizat cu enzima de restricție *Pst*I, prin tehnica Gibson;
- Obținerea vectorilor recombinanți *pORI280(AD)* [*pORI280(AD)* $\Delta Imo1013$ și *pORI280(AD)* $\Delta Imo2229$] prin ligarea Gibson a fragmentelor AB și CD în vectorul *pORI280*;
- Clonarea vectorilor recombinanți, *pORI280(AD)* $\Delta Imo1013$ și *pORI280(AD)* $\Delta Imo2229$, în celulele de *E. coli* EC10B;
- Verificarea vectorilor recombinanți, *pORI280(AD)* $\Delta Imo1013$ și *pORI280(AD)* $\Delta Imo2229$, prin digestia acestora cu enzimele de restricție *Bgl*II/*Not*I;
- Transformarea celulelor de *L. monocytogenes* EGDe electrocompetente cu vectorii recombinanți *pORI280(AD)* $\Delta Imo1013$, respectiv *pORI280(AD)* $\Delta Imo2229$, și vectorul termosensibil ajutător *pVE6007* RepA⁺;
- Inducerea recombinării homoloage la nivelul cromozomului *L. monocytogenes* EGDe în vederea deleției genelor țintă *Imo1013*, respectiv *Imo2229*, evidențiată prin Colony PCR;
- Confirmarea, prin NGS, a deleției genelor *Imo1013*, respectiv *Imo2229*, din genomul *L. monocytogenes* EGDe.

CAPITOLUL IV

Caracterizarea fenotipică a tulpinilor mutante construite, *Listeria monocytogenes* EGDe $\Delta Imo1013$ și *Listeria monocytogenes* EGDe $\Delta Imo2229$

În acest capitol, a fost realizată caracterizarea fenotipică a tulpinilor mutante construite, *L. monocytogenes* EGDe $\Delta Imo1013$ și *L. monocytogenes* EGDe $\Delta Imo2229$, utilizând drept referință tulpina sălbatică, *L. monocytogenes* EGDe. Aspectele urmărite au constat în capacitatea de creștere, în condiții de laborator, a celulelor mutante, caracteristicile morfologice ale acestora, motilitatea și capacitatea de a forma biofilm pe suprafață din polistiren.

Rezultate și discuții

Determinarea dinamicii de creștere, la temperatura de 37°C, a tulpinilor mutante de *L. monocytogenes*

Dinamica de creștere a celulelor mutante, $\Delta Imo1013$ și $\Delta Imo2229$, comparativ cu cea a celulelor de tip sălbatic, a fost determinată prin cultivare submersă discontinuă. Astfel, celulele de *L. monocytogenes* au fost inoculate într-un volum limitat de mediu de cultură TSB-YE (50

Construcția a două tulpini mutante de *Listeria monocytogenes* în vederea evidențierii mecanismului de rezistență a bacteriei la presiuni înalte și caracterizarea acestora

mL) și crescute la temperatura de 37°C, timp de 24 de ore. Pe durata primelor 12 ore de incubare, la intervale de 2 ore, au fost prelevate probe și analizate în vederea determinării DO₆₀₀ și a numărului de celule (UFC/mL). Probele de celule finale au fost prelevate după 24 de ore de incubare și analizate în mod similar.

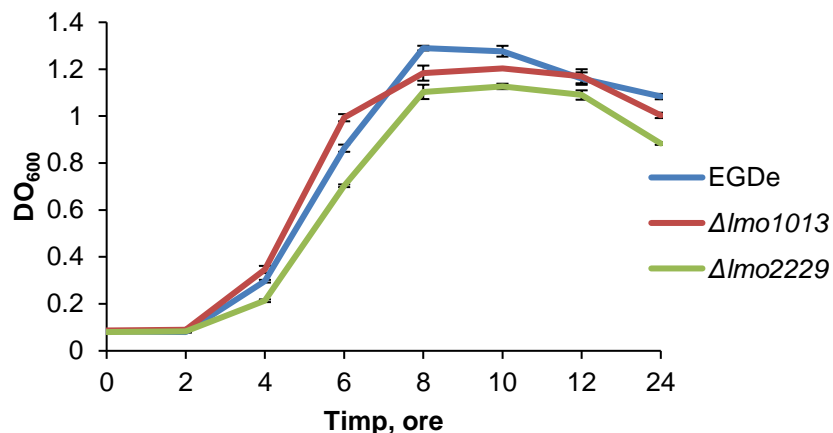


Figura 4.1. Dinamica de creștere a tulpinilor mutante, *L. monocytogenes* EGDe ΔImo1013 și *L. monocytogenes* EGDe ΔImo2229, față de cea a tulpinii sălbatică, *L. monocytogenes* EGDe, la temperatura de 37°C

Curbele privind dinamica de creștere a celulelor de *L. monocytogenes* la 37°C, timp de 24 de ore, monitorizată prin determinarea densității optice (DO₆₀₀) a culturilor, sunt reprezentate grafic în **Figura 4.1**. Celulele mutante ΔImo1013 s-au comportat asemănător cu cele de tip sălbatic, excepție făcând instalarea mai timpurie a fazei de creștere staționare. Pe de altă parte, celulele mutante ΔImo2229 au indicat un ritm de creștere mai lent. Timpul de generație a populațiilor de *L. monocytogenes* studiate este prezentat în **Tabelul 4.1**. În cazul tulpinii sălbatică, *L. monocytogenes* EGDe, acesta a fost de 1,16 ore. În conformitate cu observațiile făcute anterior, mutantul *L. monocytogenes* EGDe ΔImo1013 a prezentat un timp de generație (1,15 ore) comparativ cu cel al tulpinii sălbatică, pe când cel al mutantului *L. monocytogenes* EGDe ΔImo2229 (1,29 ore) a fost mai mare.

Tabelul 4.1. Timpul de generație al celulelor de *L. monocytogenes*, tulpina sălbatică și mutantii, la temperatura de 37°C

Tulpină	Timp de generație, ore
<i>L. monocytogenes</i> EGDe	1,16
<i>L. monocytogenes</i> EGDe ΔImo1013	1,15
<i>L. monocytogenes</i> EGDe ΔImo2229	1,29

Deși PBP A2 este dispensabilă viabilității celulelor, acestea cresc mai greu față de celulele de tip sălbatic. Studiul efectuat de [Zawadzka-Skomial et al., \(2006\)](#) confirmă faptul că, prin inactivarea proteinei codificate de genă, PBP A2, capacitatea de creștere a celulelor mutante este afectată.

Prin analiza probelor prelevate după 24 de ore de incubare la 37°C, a fost constatată faza de declin. Numărul celulelor viabile a scăzut cu aproximativ 1 log UFC/mL, în cazul *L.*

monocytogenes EGDe și al *L. monocytogenes* EGDe $\Delta lmo2229$, și cu mai mult de 2 log UFC/mL, în cazul *L. monocytogenes* EGDe $\Delta lmo1013$, față de numărul acestora observat după 12 ore de incubare (**Tabelul 4.2**).

Tabelul 4.2. Numărul de celule viabile de *L. monocytogenes* (log UFC/mL) determinat la fiecare timp de analiză a culturilor incubate la temperatura de 37°C

Timp, ore	Număr de celule, log UFC/mL		
	<i>L. monocytogenes</i> EGDe	<i>L. monocytogenes</i> EGDe $\Delta lmo1013$	<i>L. monocytogenes</i> EGDe $\Delta lmo2229$
0	7,07	7,25	7,23
2	7,25	7,41	7,04
4	8,11	8,23	8,14
6	8,69	8,44	8,49
8	8,74	8,69	8,8
10	8,84	8,49	8,55
12	8,77	8,5	7,86
24	7,84	6,38	7,65

Faza de declin mai accentuată, observată în cazul celulelor mutante $\Delta lmo1013$, poate fi o consecință a eliminării canalelor ionice mecanosensibile de conductanță mică, Lmo1013, care contribuie la menținerea integrității structurale a bacteriilor pe durata fazei de creștere staționară.

Determinarea caracteristicilor morfologice ale celulelor de *L. monocytogenes* mutante

În faza de creștere exponențială, celulele mutante $\Delta lmo1013$ au prezentat, parțial, o formă anormală, comparativ cu celulele de tip sălbatic (**Figura 4.3. B**). În cazul celulelor mutante $\Delta lmo2229$, septul de diviziune transversal a determinat formarea unor celule inegale ca lungime (**Figura 4.3. C**). Mai mult, comparativ cu celulele de tip sălbatic, celulele mutante $\Delta lmo2229$ au prezentat tendința de a forma filamente, comportament care ar putea fi pus pe seama unui defect privind diviziunea celulară (**Figura 4.4**). Pentru o analiză mai precisă a efectului pe care îl au mutațiile induse (deleția genelor *lmo1013*, respectiv *lmo2229*) asupra morfologiei celulelor de *L. monocytogenes* EGDe, au fost măsurate câte 40 de celule cu ajutorul programului ImageJ, în vederea determinării lungimii și a diametrului acestora. În conformitate cu imaginile SEM obținute pentru celulele de *L. monocytogenes* aflate în fază staționară de creștere, în ceea ce privește lungimea medie (**Figura 4.5**), nu s-a constatat o diferență semnificativă ($p = 0,708$) între celulele mutante $\Delta lmo1013$ ($1,248 \pm 0,169 \mu\text{m}$) și cele de tip sălbatic ($1,221 \pm 0,159 \mu\text{m}$). În schimb, diametrul mediu al celulelor mutante $\Delta lmo1013$ ($0,568 \pm 0,039 \mu\text{m}$) a fost semnificativ mai mare ($p < 0,001$) față de cel al celulelor sălbatice ($0,496 \pm 0,04 \mu\text{m}$) (**Figura 4.6**). [Bachin et al. \(2015\)](#) au observat, de asemenea, că în urma inactivării genei *mscL* (gena codificatoare a canalelor mecanosensibile de conductanță mare) în *Synechocystis* sp. PCC 6803 (cianobacterii), celulele mutante prezintă un diametru mai mare comparativ cu cel al celor de tip sălbatic.

Celulele mutante $\Delta lmo2229$ au prezentat o lungime medie ($1,364 \pm 0,17 \mu\text{m}$) mai mare ($p < 0,001$) față de cea a celor de tip sălbatic. De subliniat, în acest caz, este faptul că lungimile determinate au fost eterogene, putând atinge valori de până la 25 μm . Mai mult, diametrul mediu al celulelor mutante $\Delta lmo2229$ ($0,449 \pm 0,038 \mu\text{m}$) a fost mai mic ($p < 0,001$) față de cel al

Construcția a două tulpini mutante de *Listeria monocytogenes* în vederea evidențierii mecanismului de rezistență a bacteriei la presiuni înalte și caracterizarea acestora

celulelor sălbatice. Studiul privind rolul PBPs în morfologia bacteriilor, efectuat de Popham și Young (2003), a concluzionat că modificărilor de formă a bacteriilor deficiente în PBPs aparținând clasei A pot fi o urmare a perturbării biosintezei peretelui celular cauzate de lipsa de coordonare dintre procesele de alungire și septare a celulelor.

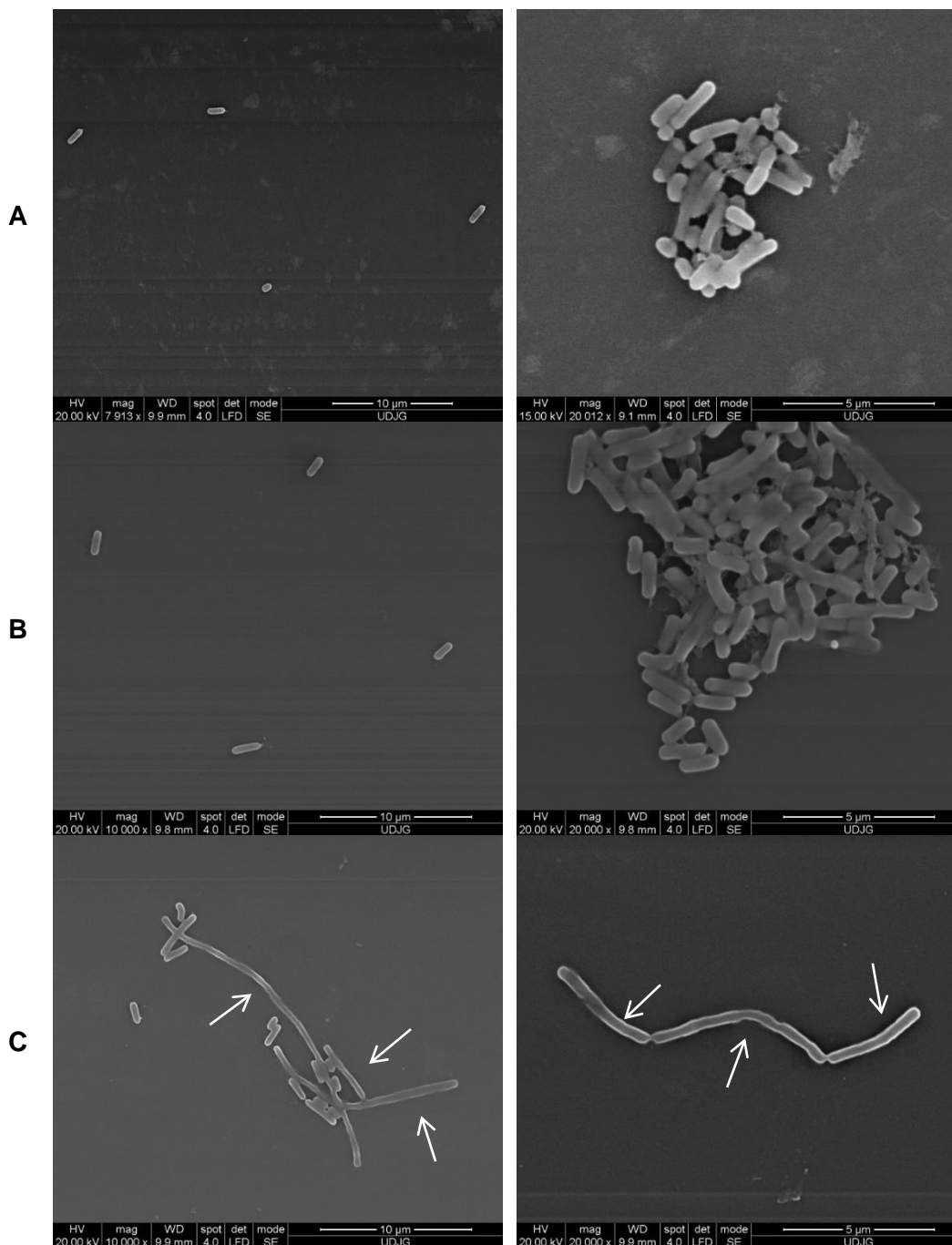


Figura 4.3. Morfologia celulelor de *L. monocytogenes* aflate în fază de creștere staționară: **A** – *L. monocytogenes* EGDe; **B** – *L. monocytogenes* EGDe Δmo1013; **C** – *L. monocytogenes* EGDe Δmo2229 (analiză SEM). Săgețile indică celule cu formă anormală

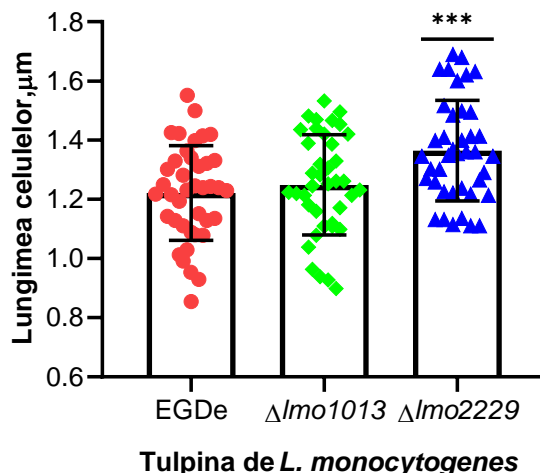


Figura 4.4. Lungimea celulelor de *L. monocytogenes* EGDe, *L. monocytogenes* EGDe Δ Imo1013 și *L. monocytogenes* EGDe Δ Imo2229 aflate în fază staționară de creștere ($n = 40$). Pentru analiza statistică, s-a aplicat analiza dispersională (ANOVA), urmată de testul Dunnett de comparație multiplă, unde lungimea celulelor de *L. monocytogenes* EGDe a reprezentat controlul (** $p < 0,001$)

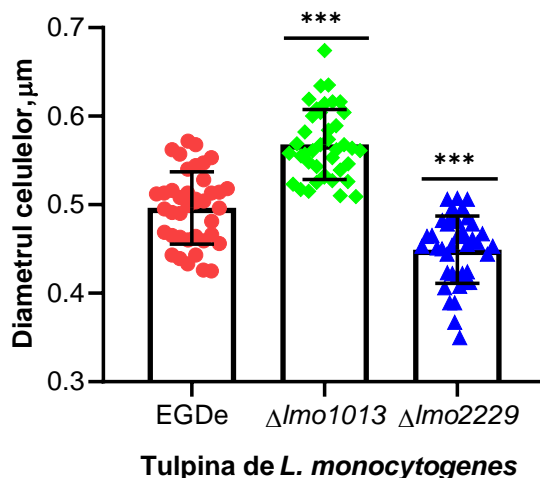


Figura 4.5. Diametrul celulelor de *L. monocytogenes* EGDe, *L. monocytogenes* EGDe Δ Imo1013 și *L. monocytogenes* EGDe Δ Imo2229 aflate în fază staționară de creștere ($n = 40$). Pentru analiza statistică, s-a aplicat analiza dispersională (ANOVA), urmată de testul Dunnett de comparație multiplă, unde diametrul celulelor de *L. monocytogenes* EGDe a reprezentat controlul (** $p < 0,001$)

Motilitatea tulpinilor de *L. monocytogenes* mutante

Această etapă a studiului fenotipic a avut drept scop evaluarea motilității tulpinilor mutante, *L. monocytogenes* EGDe Δ Imo1013 și *L. monocytogenes* EGDe Δ Imo2229, în comparație cu cea a tulpinii sălbatice, *L. monocytogenes* EGDe. Celulele au fost cultivate la temperatura de 25°C în vederea dezvoltării flagelilor peritrichi, întrucât studiile au arătat că expresia genelor implicate în motilitatea *L. monocytogenes* este reglată în sens negativ de represorul MogR la

Construcția a două tulpini mutante de *Listeria monocytogenes* în vederea evidențierii mecanismului de rezistență a bacteriei la presiuni înalte și caracterizarea acestora

temperaturi mai mari de 30°C (Shen și Higgins, 2006), și, apoi, inoculate, prin tehnica spotării, pe mediu de cultură semisolid (0,3% agar) pentru analiza capacității acestora de migrare.

Atât după 24, cât și după 48 de ore de incubare la temperatura de 25°C (Figura 4.6), prin determinarea diametrului zonei de creștere aferent migrării bacteriilor, s-a constatat că nu există diferențe semnificative ($p > 0,05$) între tulpinile mutante și tulpina sălbatică, în ceea ce privește motilitatea. În schimb, după 120 de ore de incubare a coloniilor la temperatura de 25°C, s-a constatat o motilitate mai scăzută a tulpinilor mutante ($p < 0,001$), *L. monocytogenes* EGDe $\Delta lmo1013$ și *L. monocytogenes* EGDe $\Delta lmo2229$, față de cea a tulpinii sălbatică, *L. monocytogenes* EGDe, cu ~ 17, respectiv ~ 24%.

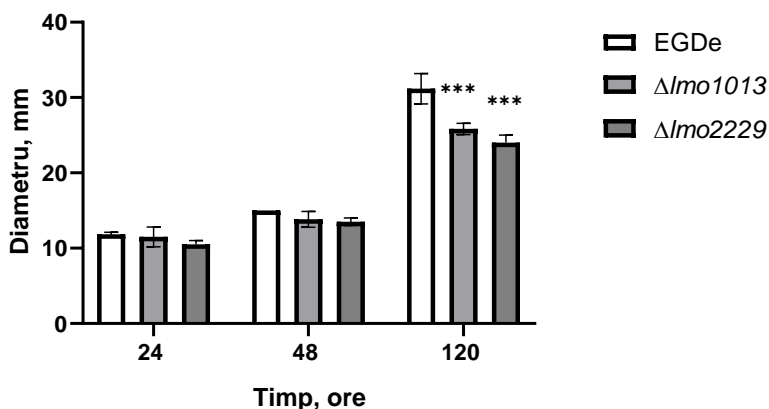


Figura 4.6. Cuantificarea diametrului zonei de creștere din jurul inoculării prin spotare a tulpinilor de *L. monocytogenes* în plăci cu 0,3% agar TSB-YE după incubare la 25°C timp de 24, 48 și 120 de ore. Valorile reprezintă media \pm deviația standard a trei experimente independente. Pentru analiza statistică, s-a aplicat analiza dispersională (ANOVA), urmată de testul Dunnett de comparație multiplă, unde tulpina sălbatică, *L. monocytogenes* EGDe, a reprezentat controlul (** $p < 0,001$)

Aspectul rugos al coloniei formate de tulpina mutantă *L. monocytogenes* EGDe $\Delta lmo2229$ (Figura 4.7.) și motilitatea acesteia mai scăzută în raport cu tulpina sălbatică pot fi asociate cu fenomenul de înlănțuire a celulelor, observat prin analiza acestora la microscopul electronic cu scanare. Observații similare au fost făcute și de Durack *et al.* (2014), în cazul tulpinii mutante *L. monocytogenes* 10403S $\Delta secA2$ cu un defect la nivelul sistemului de secreție a enzimelor autolitice, SecA2.

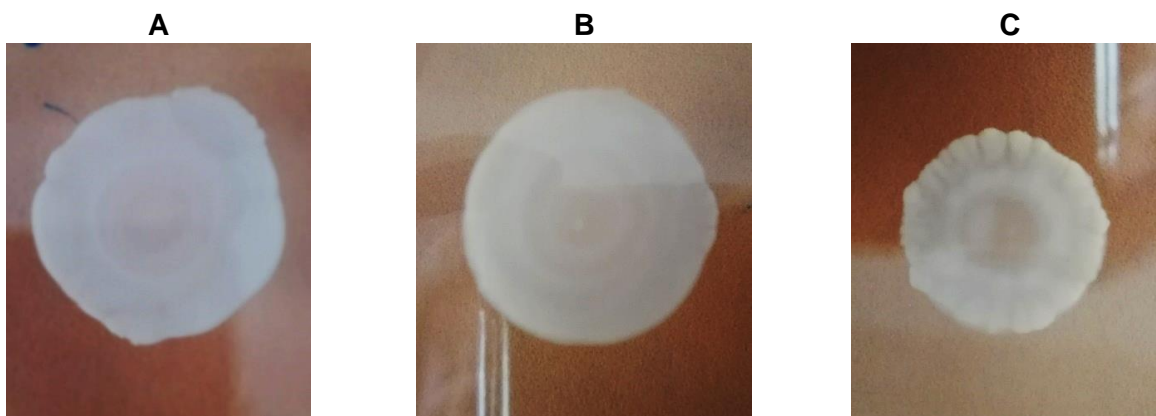


Figura 4.7. Imagini privind motilitatea celulelor de *L. monocytogenes* pe mediu de cultură TSB-YE semisolid (0,3% agar), incubate la temperatura de 25°C, timp de 120 de ore. **A** – *L. monocytogenes* EGDe; **B** – *L. monocytogenes* EGDe Δ Imo1013; **C** – *L. monocytogenes* EGDe Δ Imo2229

Tulpina sălbatică, *L. monocytogenes* EGDe, și tulpina mutantă, *L. monocytogenes* EGDe Δ Imo1013, au format colonii cu spect neted, în cazul cărora a putut fi observată formarea unor inele concentrice asociate ritmului de migrare circadian (**Figura 4.7**). Inelele concentrice sunt determinate de alternarea zonelor cu biomasă opacă cu zone în care biomasa are aspect translucid. Biomasa opacă corespunde producerii de substanțe polimerice extracelulare, substanțe a căror producere nu are loc și în cazul celulelor ce formează biomasa translucidă (Kaval *et al.*, 2015).

Capacitatea tulpinilor de *L. monocytogenes* mutante de a forma biofilm

Studiul de față a avut drept scop evaluare capacității tulpinilor mutante, *L. monocytogenes* EGDe Δ Imo1013 și *L. monocytogenes* EGDe Δ Imo2229, de a forma biofilm, în comparație cu tulpina sălbatică, *L. monocytogenes* EGDe. Cultivarea biofilmelor s-a realizat în condiții statice, în plăci de microtitrare din polistiren, la trei temperaturi diferite (25, 30 și 37°C), iar cantitatea de biofilm format a fost cuantificată prin colorarea matricei acestuia cu cristal violet.

În general, studiile au arătat că *L. monocytogenes* prezintă o capacitate slabă spre moderată de a forma biofilm (Barbosa *et al.*, 2013), dar, cu toate acestea, unele tulpini pot adera puternic la suprafețele abiotice (Borucki *et al.*, 2003). Conform studiului efectuat de Doijad *et al.* (2015), în funcție de capacitatea de a forma biofilm la temperatura de 37°C, tulpinile de *L. monocytogenes* pot fi clasificate astfel: tulpini formatoare de biofilm slab ($DO_{595} = 0,0 \div 0,3$), tulpini formatoare de biofilm moderat ($DO_{595} = 0,4 \div 0,6$) și tulpini formatoare de biofilm puternic ($DO_{595} = 0,7 \div 0,9$). În cazul de față, atât tulpina sălbatică, *L. monocytogenes* EGDe, cât și tulpinile mutante, *L. monocytogenes* EGDe Δ Imo1013 și *L. monocytogenes* Δ Imo2229, au prezentat o capacitate moderată de a forma biofilm, la 37°C. La această temperatură, diferența dintre celulele mutante, Δ Imo1013 și Δ Imo2229, și cele de tip sălbatic, în ceea ce privește capacitatea de formare a biofilmului, nu a fost una semnificativă ($p = 0,12$, respectiv 0,07).

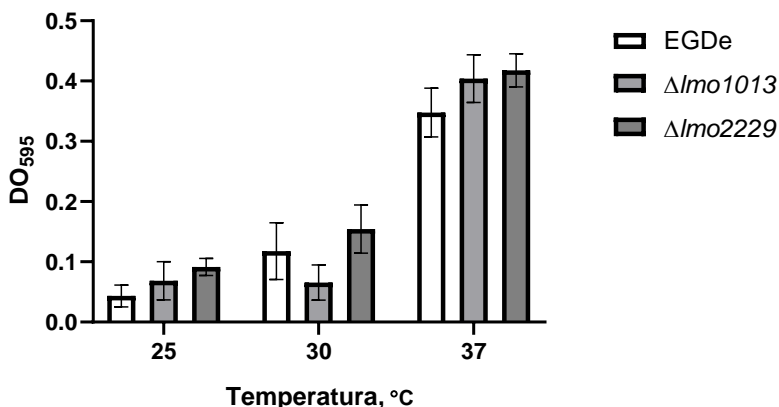


Figura 4.8. Capacitatea tulpinilor mutante, *L. monocytogenes* EGDe $\Delta Imo1013$ și *L. monocytogenes* EGDe $\Delta Imo2229$, de a forma biofilm, comparativ cu tulpina sălbatică, *L. monocytogenes* EGDe. Cuantificarea cantității de biofilm format a fost realizată prin colorare cu CV 1% și citire a densității optice la 595 nm. Valorile reprezintă media a trei experimente independente \pm deviația standard. Pentru analiza statistică, s-a aplicat analiza dispersională (ANOVA), urmată de testul Dunnett de comparație multiplă, unde tulpina sălbatică, *L. monocytogenes* EGDe, a reprezentat controlul

Temperatura de incubare a influențat semnificativ ($p < 0,001$) cantitatea de biofilm format (**Figura 4.8**), cu precădere cea de 37°C. Influența temperaturii de incubare a fost indicată și de alte studii efectuate în această direcție (Briandet *et al.*, 1999; Di Bonaventura *et al.*, 2008), care au observat că, odată cu creșterea temperaturii de incubare, crește și nivelul de hidrofobicitate a suprafeței celulare, ceea ce favorizează aderența bacteriilor pe suprafețele inerte. Astfel, faptul că, după incubare la temperaturile de 30, respectiv 25°C, tulpinile în cauză au format mai puțin biofilm, este explicabil. În acest caz, cantitatea de biofilm produsă de tulpinile mutante nu a diferit ($p > 0,05$) de cea produsă de tulpina sălbatică.

Concluzii

Tulpinile mutante, *L. monocytogenes* EGDe $\Delta Imo1013$ și *L. monocytogenes* EGDe $\Delta Imo2229$, obținute prin deleția genelor *Imo1013*, respectiv, *Imo2229* din genomul *L. monocytogenes* EGDe, au relevat aspect fenotipice diferite, comparativ cu tulpina sălbatică, în ceea ce privește creșterea, caracteristicile morfologice și motilitatea. Astfel:

- Deși tulpina mutantă *L. monocytogenes* EGDe $\Delta Imo1013$ prezintă un comportament de creștere relativ similar cu cel al tulpinii sălbatică, în fază exponențială de creștere, aceasta devine mai sensibilă odată cu instalarea fazei de creștere staționare, fapt evidențiat printr-un declin al populației mai accentuat;
- Tulpina mutantă *L. monocytogenes* EGDe $\Delta Imo2229$ crește mai greu comparativ cu tulpina sălbatică, aspect care reiese și din calculul timpului de generație al celulelor în fază de creștere exponențială;

- Celulele mutante $\Delta lmo1013$ prezintă morfologie diferită față de cele sălbatice, caracterizându-se printr-un diametru mai mare;
- Celulele mutante $\Delta lmo2229$ diferă, din punct de vedere morfologic, de cele sălbatice, în ceea ce privește lungimea și diametrul acestora, având tendința de a forma filamente, ca urmare a unui posibil defect de diviziune;
- Motilitatea tulpinilor mutante devine mai scăzută, în timp, comparativ cu cea a tulpinii sălbatice. Motilitatea mutantului $\Delta lmo2229$ este mult mai afectată ca urmare, cel mai probabil, a fenotipului de înlănțuire a celulelor.

În ceea ce privește capacitatea de formare a biofilmului, tulpinile mutante se comportă similar cu tulpina sălbatică, indiferent de temperatura la care s-a realizat incubarea celulelor.

CAPITOLUL V

Rezistența tulpinilor mutante, *Listeria monocytogenes* EGDe $\Delta lmo1013$ și *Listeria monocytogenes* EGDe $\Delta lmo2229$, la presiuni înalte și alți factori de stres asociați cu produsele alimentare

Studiile experimentale de față au avut scopul de a evalua rezistența tulpinilor de *L. monocytogenes* modificate genetic, *L. monocytogenes* EGDe $\Delta lmo1013$ și *L. monocytogenes* EGDe $\Delta lmo2229$, în comparație cu tulpina sălbatică, la tratamentul la presiuni înalte, indicându-se, astfel, contribuția proteinelor codificate de genele eliminate la barotoleranța și/sau mecanismele moleculare prin care bacteria se poate recupera. De asemenea, a fost analizată rezistența tulpinilor mutante construite și la alte condiții de stres asociate cu produsele alimentare, precum stresul osmotic (stresul hiperosmotic sau hipoosmotic) și prezența nazinei.

Rezultate și discuții

Rezistența tulpinilor de *L. monocytogenes* mutante la tratamentul la presiuni înalte

Cercetarea de față a avut scopul de a evalua rezistența tulpinilor mutante construite, *L. monocytogenes* EGDe $\Delta lmo1013$ și *L. monocytogenes* EGDe $\Delta lmo2229$, față de cea a tulpinii sălbatice, *L. monocytogenes* EGDe, la HPP. Rezultatele privind viabilitatea celulelor mutante $\Delta lmo1013$ și $\Delta lmo2229$ după tratamentele la 300, 350 și 400 MPa, 8°C, 5 min, în comparație cu cea a celulelor de tip sălbatic, sunt redată în **Figura 5.1**.

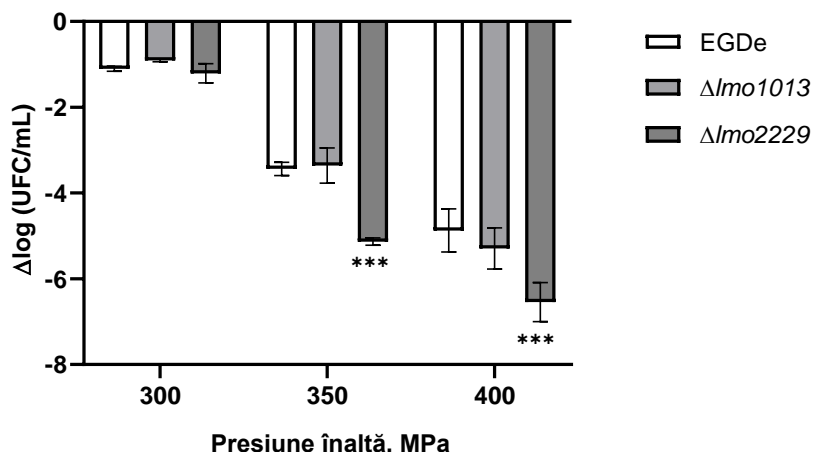


Figura 5.1. Rezistența *L. monocytogenes* EGDe, *L. monocytogenes* EGDe $\Delta lmo1013$ și a *L. monocytogenes* EGDe $\Delta lmo2229$ la HPP (300, 350 și 400 MPa, 8°C, 5 min). Valorile reprezintă media \pm deviația standard a trei replicat. Pentru analiza statistică, s-a aplicat analiza dispersională (ANOVA) urmată de testul Dunnett de comparație multiplă, unde tulpina sălbatică, *L. monocytogenes* EGDe, a reprezentat controlul (** $p < 0,001$)

Tratamentul la 300 MPa, 8°C, 5 min, a determinat reducerea numărului de celule sălbatice și mutante, $\Delta lmo1013$, respectiv $\Delta lmo2229$, cu aproximativ 1 log UFC/mL față de controlul aferent, rezistența tulpinilor mutante la acest tratament fiind, prin urmare, similară cu cea a tulpinii sălbatice ($p > 0,9$). În urma tratamentului la 350 MPa, viabilitatea celulelor sălbatice, cât și cea a celulelor mutante $\Delta lmo1013$, a scăzut cu aproximativ 3 log UFC/mL față de control. Pe de altă parte, numărul de celule viabile, în ceea ce privește mutantul $\Delta lmo2229$, a scăzut cu aproximativ 5 log UFC/mL față de control, acestea fiind afectate într-o măsură semnificativ mai mare ($p < 0,001$) de tratamentul la 350 MPa față de celulele sălbatice. Tratamentul la 400 MPa a determinat reducerea numărului de celule sălbatice și pe cel al celulelor mutante $\Delta lmo1013$ cu aproximativ 5 log UFC/mL, celulele mutante $\Delta lmo2229$ fiind afectate într-o măsură mai mare ($p = 0,002$), caz în care numărul acestora a scăzut cu aproximativ 6 log UFC/mL.

Plecând de la caracterizarea morfologică și fiziologică a celulelor de *L. monocytogenes* expuse la presiune înaltă (Ritz *et al.*, 2001), inducerea susceptibilității peretelui celular și a membranei constituie o strategie promițătoare de prevenire a recuperării bacteriei. În funcție de intensitatea la care este aplicată, presiunea înaltă poate induce stres mecanic la nivelul peretelui celular, deteriorând structura acestuia (Woldemariam și Emire, 2019). În acest context, stabilitatea peretelui celular constituie un factor important în rezistența celulelor bacteriene la HPP (Manas și Mackey, 2004). Astfel, susceptibilitatea mai crescută a celulelor mutante $\Delta lmo2229$ la acțiunea HPP ar putea fi determinată de o inhibare a procesului de reparare a leziunilor cauzate de HPP la nivelul peretelui celular, în lipsa proteinei PBP A2, cu rol în încorporarea de noi straturi de peptidoglican. Studii recente indică funcția esențială a clasei A de PBPs pentru integritatea mecanică a peretelui celular și repararea activă a leziunilor survenite la nivelul acestuia (Lai *et al.*, 2017; Vigouroux *et al.*, 2020).

Eliminarea genei care codifică MscS nu a indus o susceptibilitate mai crescută a celulelor mutante la tratamentele aplicate, față de cea a tulpinii sălbatice, ceea ce sugerează că aceste

canale mecanosenzitive nu sunt implicate direct în rezistența celulelor listeriale la HPP. Prin urmare, rezistența celulelor mutante $\Delta lmo1013$ la HPP, similară cu cea a celulelor sălbatice, ar putea fi determinată de activarea canalelor ionice mecanosenzitive de conductanță mare prezente la nivelul membranei celulare. Pentru confirmarea acestei ipoteze, este necesară deleția genei codificatoare a canalelor ionice mecanosenzitive de conductanță mare și testarea rezistenței la HPP a noii tulpini mutante, în comparație cu tulpina sălbatică.

Rezistența tulpinilor de *L. monocytogenes* mutante la stresul osmotic

Rezistența la stresul hiperosmotic

Prin acest studiu s-a urmărit evaluarea toleranței tulpinilor mutante, *L. monocytogenes* EGDe $\Delta lmo1013$ și *L. monocytogenes* EGDe $\Delta lmo2229$, comparativ cu cea a tulpinii sălbatice, *L. monocytogenes* EGDe, față de stresul hiperosmotic indus prin adăugarea de 1 până la 10% (m/v) NaCl în mediul de cultură. În **Figura 5.2** este indicată capacitatea tulpinilor studiate de a prolifera în condiții de stres hiperosmotic, luându-se drept reper creșterea acestora în mediu de cultură fără adaos suplimentar de NaCl (controlul negativ). Din grafic reiese că, odată cu creșterea concentrației de NaCl, scade capacitatea celulelor listeriale de a prolifera.

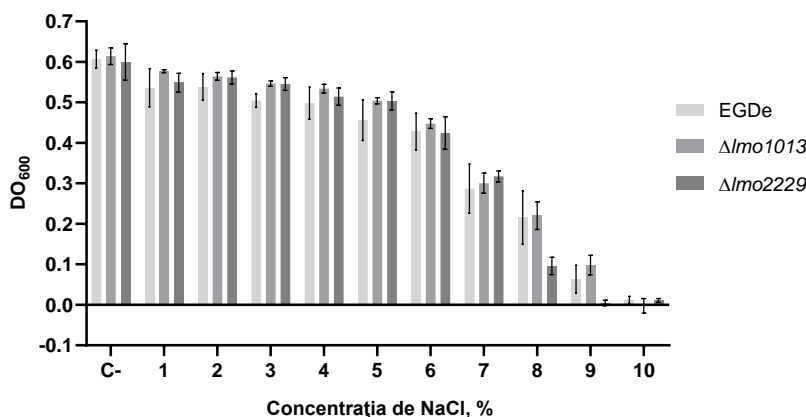


Figura 5.2. Densitatea optică (DO_{600}) a microculturilor de *L. monocytogenes* EGDe, *L. monocytogenes* EGDe $\Delta lmo1013$ și *L. monocytogenes* EGDe $\Delta lmo2229$ în condiții hiperosmotice induse prin adăugarea de 1 până la 10% NaCl în mediul de creștere; C- (controlul negativ). Valorile reprezintă media \pm deviația standard a trei replicare

După cum se poate observa, toate cele trei tulpini au fost inhibitate la o concentrație de 10% NaCl. Interesant, tulpina mutantă *L. monocytogenes* EGDe $\Delta lmo2229$ a indicat o sensibilitate mai mare la stresul hiperosmotic față de tulpina sălbatică, tolerând concentrații de NaCl de până la 8%. În ceea ce privește creșterea tulpinii în prezență de 8% NaCl, s-a constatat, de asemenea, o capacitate de proliferare semnificativ mai scăzută ($p < 0,05$) față de cea a tulpinii sălbatice. Studiile anterioare au indicat modificarea structurii peretelui celular ca strategie de rezistență a *L. monocytogenes* la hiperosmolaritate (Bergholz *et al.*, 2012; Burall *et al.*, 2015). Mai mult decât atât, studiul condus de Durack *et al.* (2015) a evidențiat supraexprimarea genelor asociate cu biosinteza peretelui celular, ca urmare a expunerii *L. monocytogenes* la stresul hiperosmotic. Toate aceste aspecte sugerează importanța capacității

L. monocytogenes de a ajusta proprietățile mecanice ale peretelui celular pentru a tolera concentrații mari de NaCl din mediul extracelular. Prin urmare, sensibilitatea mai crescută a tulpinii mutante *L. monocytogenes* EGDe $\Delta Imo2229$, deficientă în PBP A2, la stresul hiperosmotic accentuat sugerează contribuția proteinei eliminate la mecanismul de osmotoleranță a bacteriei.

Pe de altă parte, tulpina mutantă *L. monocytogenes* EGDe $\Delta Imo1013$ a prezentat un comportament similar ($p > 0,05$) cu cel al tulpinii sălbatică, ambele tulpini tolerând o concentrație de NaCl de maximum 9%. Acest rezultat sugerează că gena *Imo1013*, care codifică canalele ionice mecanosensibile de conductanță mică, este dispensabilă creșterii celulelor de *L. monocytogenes* EGDe în mediu cu osmolaritate crescută. Un fenotip similar, determinat de eliminarea canalelor mecanosensibile de conductanță mică în *Bacillus (B.) subtilis*, a fost observat și de Hoffmann *et al.* (2008).

Rezistența la șocul hipoosmotic

Pentru a testa capacitatea tulpinilor mutante *L. monocytogenes* EGDe $\Delta Imo1013$ și *L. monocytogenes* EGDe $\Delta Imo2229$ de a supraviețui, comparativ cu tulpina sălbatică, în urma unui șoc hipoosmotic sever, celulele listeriale au fost crescute în prezență de 0,8 M NaCl, până la atingerea fazei exponențiale de mijloc ($DO_{600} = \sim 0,5$), culturile fiind, apoi, diluate brusc în mediu de cultură fără adaos suplimentar de NaCl (0,12 M NaCl).

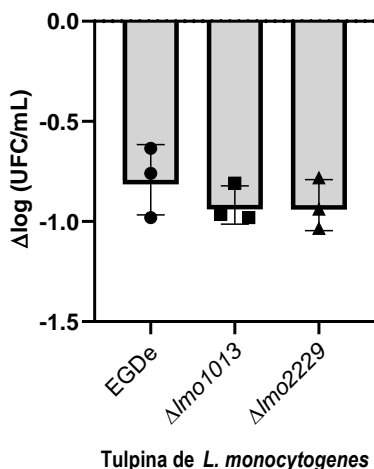


Figura 5.3. Rezistența *L. monocytogenes* EGDe, *L. monocytogenes* EGDe $\Delta Imo1013$ și a *L. monocytogenes* EGDe $\Delta Imo2229$ la șocul hipoosmotic. Valorile reprezintă media \pm deviația standard a trei replicare. Pentru analiza statistică, s-a aplicat analiza dispersională (ANOVA) urmată de testul Dunnett de comparație multiplă, unde tulpina sălbatică, *L. monocytogenes* EGDe, a reprezentat controlul

După inducerea șocului hipoosmotic, numărul inițial de celule a fost redus cu aproximativ 1 log UFC/mL în cazul tuturor tulpinilor analizate, neexistând o diferență semnificativă ($p > 0,5$) în ceea ce privește comportamentul celulelor sălbatică și cel al celulelor mutante, $\Delta Imo1013$, respectiv $\Delta Imo2229$ (Figura 5.3).

Capacitatea similară de supraviețuire a celulelor mutante $\Delta Imo1013$ cu cea a celulelor sălbatică indică prezența altor tipuri de canale ionice mecanosensibile în celulele de *L. monocytogenes*, cu rol în efluxul osmoliților acumulați din mediul exterior sau sintetizați pe durata creșterii acestora în mediu cu osmolaritate ridicată. Cel mai probabil, canalele ionice de

conductanță mare sunt sistemele de urgență prin care celulele de *L. monocytogenes* elimină apă și soluți în urma unui șoc hipoosmotic, după cum au observat și Hoffmann *et al.* (2008) în cazul bacteriei *B. subtilis*. Mai mult decât atât, studiile anterioare au evidențiat prezența în genomul *L. monocytogenes* EGDe a două gene, *glpF* și *Imo1539*, care prezintă similaritate semnificativă cu genele codificatoare a aquaporinelor, canale specifice transportului de apă cu rol important în rezistența celulelor listeriale în timpul unui șoc hipoosmotic (Sleator *et al.*, 2003).

Rezultatul privind rezistența celulelor mutante Δ *Imo2229* la șocul hipoosmotic indus, similară cu cea a tulpinii sălbatice, indică faptul că rezistența peretelui celular nu este afectată de eliminarea PBP A2, acesta fiind suficient de rigid pentru a preveni liza celulei în urma acumulării unui volum masiv de apă. Acest aspect nu este deloc surprinzător, având în vedere prezența, în celule de *L. monocytogenes* EGDe, a altor PBPs cu funcție transpeptidazică (PBP A1, PBP B1, PBP B2, PBP B3), care asigură rigiditatea peptidoglicanului prin legarea încrucișată a lanțurilor glicanice.

Rezistența tulpinilor de *L. monocytogenes* mutante la nizină

Studiul de față a avut scopul de a evalua rezistența tulpinilor mutante, *L. monocytogenes* EGDe Δ *Imo1013* și *L. monocytogenes* EGDe Δ *Imo2229*, comparativ cu tulpina sălbatică, *L. monocytogenes* EGDe, la nizina A, o bacteriocină din familia lantibioticelor produsă de *Lactococcus lactis* spp. *lactis*. Sensibilitatea la nizină a fost stabilită prin determinarea concentrației minime de substanță care inhibă creșterea celulelor pe durata incubării la 37°C (18 ore). Nizina utilizată în cadrul acestui studiu a fost reprezentată de un produs comercial cu 2,5% substanță activă, echivalentul a $\geq 1.000.000$ U.I./g, restul fiind compus din NaCl (75%) și substanță uscată din lapte denaturată (22,5%).

Inițial, a fost aplicată tehnica microdiluțiilor binare, fiind testată sensibilitatea tulpinilor de *L. monocytogenes* la concentrații de nizină ce au variat de la 5,85 la 3.000 U.I./mL (**Figura 5.4**). În acest caz, a fost observată inhibarea creșterii tulpinii mutante *L. monocytogenes* EGDe Δ *Imo2229* la concentrația de 3.000 U.I./mL nizină. Creșterea celeilalte tulpini mutante, *L. monocytogenes* EGDe Δ *Imo1013*, precum și cea a tulpinii sălbatice, au fost mult mai puțin afectate ($p < 0,05$) de prezența nizinei în această concentrație.

Construcția a două tulpini mutante de *Listeria monocytogenes* în vederea evidențierii mecanismului de rezistență a bacteriei la presiuni înalte și caracterizarea acestora

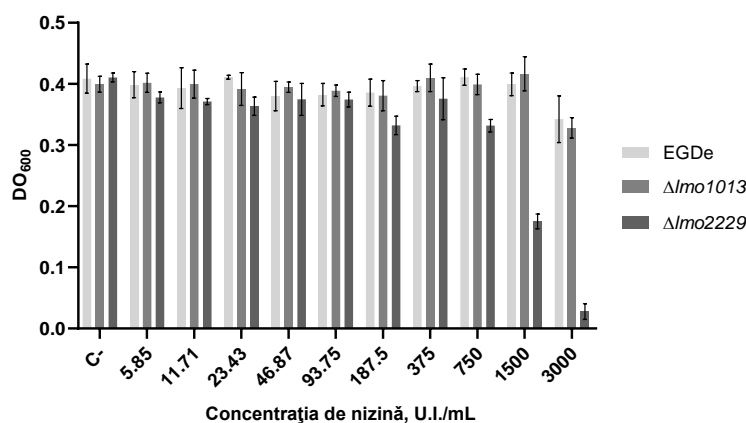


Figura 5.4. Densitatea optică (DO_{600}) a microculturilor de *L. monocytogenes* EGDe, *L. monocytogenes* EGDe $\Delta lmo1013$ și *L. monocytogenes* EGDe $\Delta lmo2229$ tratate cu nizină de concentrații ce variază de la 5,85 la 3.000 U.I./mL; C- (controlul negativ). Valorile reprezintă media \pm deviația standard a trei replicare

Din aceste considerente, s-a decis testarea sensibilității tulpinilor în cauză la concentrații mai mari de nizină, din intervalul 3.000 - 4.000 U.I./mL (**Figura 5.5**). Astfel, atât creșterea tulpinii sălbatice, cât și cea a tulpinii mutante *L. monocytogenes* EGDe $\Delta lmo1013$, au fost inhibitate la o concentrație de nizină de 3.700 U.I./mL. Prin urmare, eliminarea canalelor ionice mecanosensibile de conductanță mică, Lmo1013, nu influențează semnificativ rezistența bacteriei patogene la această bacteriocină.

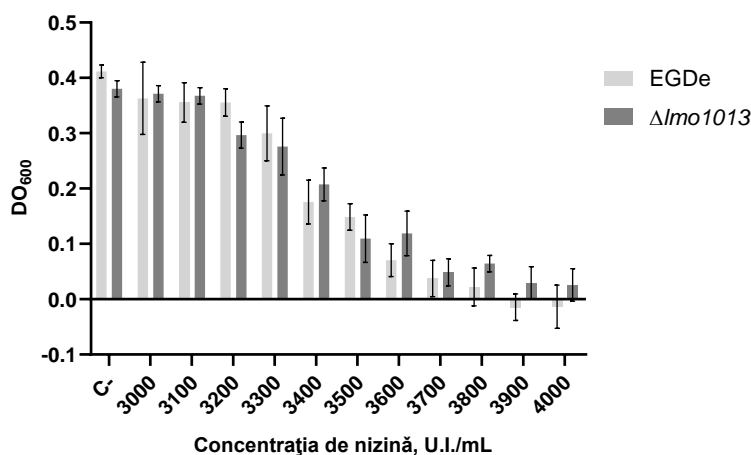


Figura 5.5. Densitatea optică a microculturilor de *L. monocytogenes* EGDe și *L. monocytogenes* EGDe $\Delta lmo1013$ tratate cu nizină de concentrații ce variază de la 3.000 la 4.000 U.I./mL; C- (controlul negativ). Valorile reprezintă media \pm deviația standard a trei replicare

În continuare, pentru a determina cu o precizie mai mare concentrația de nizină care inhibă creșterea celulelor mutante $\Delta lmo2229$, testarea rezistenței acestora a fost efectuată în intervalul 1.000 – 2.000 U.I./mL nizină (**Figura 5.6**). În cadrul acestei etape, creșterea celulelor mutante a fost inhibată la o concentrație de nizină de 1.500 U.I./mL, tulpina mutantă *L.*

monocytogenes EGDe $\Delta lmo2229$ fiind, prin urmare, de aproximativ 2,5 ori mai sensibilă la acest compus peptidic antimicrobian față de tulpina sălbatică.

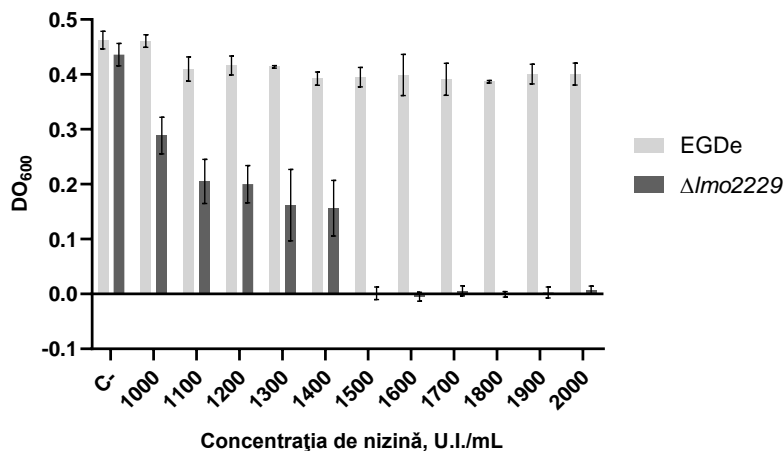


Figura 5.6. Densitatea optică a microculturilor de *L. monocytogenes* EGDe și *L. monocytogenes* EGDe $\Delta lmo2229$ tratate cu nizină de concentrații ce variază de la 2.000 la 1.000 U.I./mL; C- (controlul negativ). Valorile reprezintă media \pm deviația standard a trei replicare

Rezultatele privind sensibilitatea tulpinii mutante *L. monocytogenes* EGDe $\Delta lmo2229$ la nizină sunt în acord cu observațiile altor studii efectuate în această direcție. De exemplu, [Gravesen et al. \(2004\)](#) au arătat că expresia genei *pbp2229*, reglată de sistemul de transducție a semnalului molecular codificat de *hpk1021-rrp1022*, este direct implicată în mecanismul de rezistență la nizină a tulpinii *L. monocytogenes* 412N. În acest caz, inactivarea genelor *pbp2229* și *hpk1021*, prin mutageneză inserțională, a condus la abolirea fenotipului de rezistență la nizină. Ulterior, [Collins et al. \(2012\)](#) au confirmat, de asemenea, că gena *lmo2229*, a cărei expresie este reglată de proteina LiaR, omologul histidin-kinazei HPK1021, reprezintă un element cheie în rezistența tulpinii *L. monocytogenes* LO28 la nizină.

Concluzii

- Deleția genei *lmo1013*, din genomul *L. monocytogenes*, nu a indus susceptibilitatea bacteriei la HPP, ceea ce sugerează că familia de canalele ionice mecanosensitive de conductanță mică, Lmo1013, nu contribuie la rezistența bacteriei la acest stres;
- Eliminarea genei *lmo2229* din genomul *L. monocytogenes* a influențat semnificativ rezistența bacteriei la HPP (350 și 400 MPa, 8°C, 5 min), ceea ce sugerează că rolul PBP A2 este unul important pentru recuperarea celulelor în urma expunerii la acest stres;
- Canalele ionice mecanosensitive de conductanță mică sunt dispensabile creșterii celulelor de *L. monocytogenes* EGDe în condiții hiperosmotice, pe când proteina PBP A2 contribuie la osmotoleranța celulelor;
- Genele eliminate, *lmo1013* și *lmo2229*, codificatoare a proteinelor Lmo1013, respectiv PBP A2, nu intervin în rezistența celulelor de *L. monocytogenes* la stresul hipoosmotic,

comportamentul tulpinilor mutante, *L. monocytogenes* EGDe $\Delta Imo1013$ și *L. monocytogenes* EGDe $\Delta Imo2229$, fiind similar cu cel al tulpinii sălbatică, *L. monocytogenes* EGDe;

- Tulpina mutantă *L. monocytogenes* EGDe $\Delta Imo2229$ este de aproximativ 2,5 ori mai sensibilă la nizină față de tulpina sălbatică, ceea ce indică contribuția PBP A2, codificată de gena *Imo2229*, la rezistența bacteriei la bacteriocinele din clasa lantibioticelor (nizină), după cum a fost observat și în cazul altor tulpini de *L. monocytogenes*.

CAPITOLUL VI

Evaluarea efectului combinat al procesării la presiuni înalte și nizină asupra capacității *Listeriei monocytogenes* de a supraviețui pe șuncă gata pentru consum

Noutatea studiului constă în utilizarea unei tulpini de *L. monocytogenes* cu barotoleranță ridicată și rezistență la nizină pentru contaminare artificială a matricei alimentare supuse la HPP. Studiul propune combinarea HPP, la o intensitate mai scăzută, cu adaosul de nizină, drept posibilă alternativă la tratamentul practicat în industrie, în vederea reducerii costurilor asociate procesului, dar și a obținerii unui produs alimentar sigur pentru consum. Un alt obiectiv al cercetării de față a fost reprezentat de dezvoltarea unui model predictiv, bazat pe regresie logistică, în vederea estimării probabilității de recuperare a *L. monocytogenes* după tratamentul șuncii RTE la presiuni înalte, cu sau fără nizină.

Rezultate și discuții

Selecția unei tulpini de *L. monocytogenes* cu barotoleranță crescută

Rezistența tulpinilor de *L. monocytogenes* tratate la 400 MPa, RT, timp de un min, este prezentată în **Figura 6.1**. Tulpinile selectate pentru testarea rezistenței la HPP au fost reprezentate de izolate din produse alimentare (tulpinile AB100, AB80, ABS43, RO15 și RO4) și izolate din mediul de procesare a alimentelor (tulpinile AB120, AB199, AB204, AB24 și ABS45).

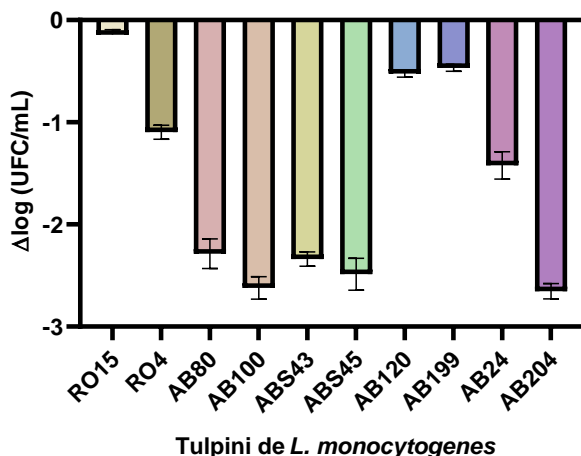


Figura 6.1. Rezistența tulpinilor de *L. monocytogenes* selectate din colecția UGAL la tratamentul la presiune înaltă (400 MPa, RT, 1 min). Valorile reprezintă media aritmetică a două experimente independente \pm deviația standard

Tulpinile care au manifestat o rezistență crescută la tratament, caz în care numărul inițial de celule listeriale a fost redus cu mai puțin de 1 log UFC/mL, au fost RO15, AB199, AB120 și RO4. Tulpinile mai puțin rezistente, al căror număr inițial de celule a fost redus cu ~ 1,5 – 2,5 log UFC/mL, au fost AB24, AB80, ABS43, ABS45, AB100 și AB204. Rezultatele obținute au indicat tulpina RO15 (serotip 4b), un izolat din hering cu condimente, ca fiind cea mai tolerantă la HPP ($p < 0,05$) dintre tulpinile de *L. monocytogenes* testate în cadrul acestui experiment.

Evaluarea rezistenței *L. monocytogenes* la nizină

L. monocytogenes RO15, tulpina selectată în urma testării barotoleranței, a fost evaluată cu privire la rezistența față de nizină, tehnica aplicată constând în metoda difuziei în agar. Caracterizarea zonelor de inhibiție produse de soluțiile de nizină de concentrații cuprinse în intervalul 0,01 – 2,5 mg/mL este redată în **Tabelul 6.1**.

Tabelul 6.1. Caracterizarea zonelor de inhibiție produse de soluțiile de nizină de concentrații din intervalul 0,01 – 2,5 mg/mL pe mediu de cultură inoculat cu *L. monocytogenes* RO15

Concentrația de nizină (mg/mL)	Tipul de inhibiție
0,01	-
0,19	-
0,039	-
0,078	-
0,156	Parțială
0,312	Parțială
0,625	Parțială
1,25	Completă
2,5	Completă

Concentrația minimă de nizină, care a produs zonă clară de inhibiție pe mediul de cultură inoculat cu *L. monocytogenes* RO15, a fost de 1,25 mg/mL, echivalentul a 1.250 U.I./mL.

Caracterizarea matricei alimentare

În **Tabelul 6.2** sunt prezentate câteva proprietăți ale matricei alimentare (șunca de Praga) utilizate în experimentele la presiuni înalte. Șunca de Praga constituie un produs alimentar care poate susține creșterea *L. monocytogenes* pe durata depozitării în condiții de refrigerare, având în vedere pH-ul acesteia aproape neutru ($6,725 \pm 0,007$), valoarea optimă a a_w -ului ($0,987 \pm 0,001$) și conținutul redus de sare (2%) (EFSA, 2018).

Tabelul 6.2. Proprietățile matricei alimentare (șunca de Praga) utilizate în experimentele la presiuni înalte

Proprietate	Valoare
pH	$6,725 \pm 0,007$
Activitatea apei	$0,987 \pm 0,001$
Conținut de sare, %	2*
Proteine, %	14*
Glucide, %	3*
Grăsimi, %	3*

Notă: *Conform producătorului

Creșterea *L. monocytogenes*, în prezența sau absența nizinei, pe șunca de Praga depozitată în condiții de refrigerare

Creșterea *L. monocytogenes* pe șunca de Praga, tratată sau nu cu nizină (25 mg/kg), în decursul a 3 săptămâni de depozitare a probelor la 4°C, este redată în **Figura 6.2**.

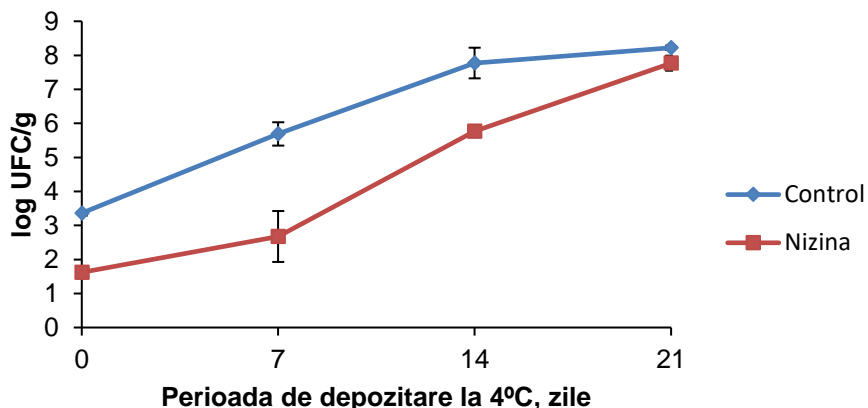


Figura 6.2. Creșterea *L. monocytogenes* pe șunca de Praga depozitată la 4°C, în absența sau prezența nizinei (25 mg/kg)

După cum era de așteptat, creșterea *L. monocytogenes* pe șunca de Praga (controlul), din momentul inoculării (ziua 0) până la sfârșitul celor 21 de zile de depozitare a acestora la 4°C, a fost una semnificativă ($p < 0,05$), populația de celule listeriale atingând, în final, valoarea de $8,22 \pm 0,06$ log UFC/g.

Față de control, nizina a redus populația inițială de *L. monocytogenes* cu $1,74 \pm 0,1$ log UFC/g ($p < 0,05$). Cu toate acestea, la sfârșitul perioadei de depozitare a șuncii la 4°C, ținând cont de evoluția concentrației de celule de *L. monocytogenes* ($7,76 \pm 0,22$ log UFC/g), se poate deduce faptul că nizina a avut o contribuție modestă în ceea ce privește controlul creșterii patogenului pe produs.

Efectul tratamentului la presiuni înalte, cu sau fără nizină, asupra supraviețuirii *L. monocytogenes* pe șunca de Praga

Comportamentul celulelor de *L. monocytogenes* pe șunca de Praga, după aplicarea tratamentelor la presiuni înalte, cu sau fără nizină, și depozitare la 4°C, timp de 21 de zile, este redat în **Figura 6.3**.

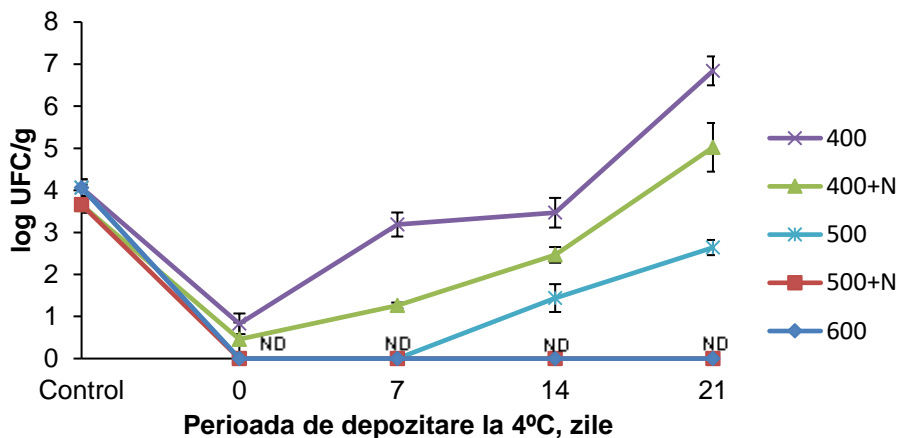


Figura 6.3. Inactivarea, după tratamentele la presiuni înalte, și recuperarea *L. monocytogenes* pe șunca de Praga, pe durata depozitării la 4°C. Testările includ controlul cu sau fără nizină (probe netratate la presiuni înalte), probele tratate la 400 MPa, 8°C, 3 min (400), probele tratate la 400 MPa, 8°C, 3 min, în prezența nizinei (25 mg/kg; 400+N), probele tratate la 500 MPa, 8°C, 3 min (500), probele tratate la 500 MPa, 8°C, 3 min, în prezența nizinei (25 mg/kg; 500+N) și probele tratate la 600 MPa, 8°C, 3 min (600); ND – nedetectabil. Valorile reprezintă media aritmetică a două replicare ± deviația standard

Imediat după aplicarea tratamentului martor (600 MPa, 8°C, 3 min), numărul de celule de *L. monocytogenes* s-a situat sub limita de detecție a metodei de numărare aplicate. În mod similar, aplicarea tratamentelor la 500 MPa, cu sau fără nizină, a determinat reducerea populației listeriale la un nivel nedetectabil. Tratamentele la 400 MPa, cu sau fără nizină, au determinat o reducere semnificativă ($p < 0,05$) a populației de *L. monocytogenes* cu $3,62 \pm 0,39$ log UFC/g, respectiv $3,26 \pm 0,24$ log UFC/g.

Pe durata depozitării în condiții de refrigerare a probelor de șuncă de Praga tratate la 600 MPa, nu a fost evidențiată prezența celulelor de *L. monocytogenes* viabile, dar necultivabile.

Deși tratamentele la 400 MPa, cu sau fără nizină, au redus considerabil numărul de celule de *L. monocytogenes*, probele în cauză nu au fost stabile din punct de vedere microbiologic pe durata depozitării în condiții de refrigerare, inițierea recuperării *L. monocytogenes* având loc după 14, respectiv 7 zile de depozitare ($p < 0,05$). În acest caz, la sfârșitul perioadei de depozitare în condiții de refrigerare a probelor de șuncă de Praga, numărul de celule de *L. monocytogenes* a depășit limita admisă de legislație, astfel că tratamentele în cauză nu sunt eficiente din perspectiva siguranței alimentare.

Cu toate că, imediat după tratamentul la 500 MPa, dar și după primele 7 zile de depozitare la 4°C, numărul de celule de *L. monocytogenes* s-a situat sub limita de detecție, s-a constatat, de-a lungul următoarelor 14 zile de depozitare, recuperarea celulelor listeriale. Concentrația celulelor de *L. monocytogenes* a atins, în final, o valoare mai mare față de cea prevăzută de legislație ($2,63 \pm 0,18$ log UFC/g). În schimb, adăugarea de bacteriocine a prevenit recuperarea patogenului de-a lungul perioadei de depozitare, procesarea la 500 MPa în prezența nizinei fiind, prin urmare, cea mai eficientă variantă de tratament combinat, dintre cele testate, împotriva *L. monocytogenes*.

Aplicarea modelării predictive în vederea determinării probabilității de recuperare a *L. monocytogenes* pe șunca de Praga procesată

Recuperarea bacteriei patogene a fost definită, în studiul de față, drept detecția unei concentrații de cel puțin 2 log UFC/g, având în vedere criteriile microbiologice prevăzute de legislația europeană cu privire la siguranța produselor alimentare. În acest context, se consideră că *L. monocytogenes* constituie un risc scăzut pentru sănătatea consumatorilor, dacă, în momentul consumului, concentrația bacteriei în produsul alimentar este mai mică de 10² UFC/g (Little *et al.*, 2009).

Rezultatele studiului experimental au fost analizate prin intermediul modelului de regresie logistică dezvoltat, descris de **Ecuția 6.1**, parametrii variabilelor fiind estimați prin utilizarea programului SPSS Statistics, aplicând procedura logistică.

$$[\ln P/(1-P)] = 3,627 - 0,018 \cdot \text{Presiune} - 0,116 \cdot \text{Nizină} + 0,356 \cdot \text{Depozitare} \quad (6.1)$$

Erorile standard ale parametrilor de regresie estimați, alături de semnificațiile statistice, sunt prezentate în **Tabelul 6.3**. Conform acestora, presiunea înaltă aplicată și perioada de depozitare a produsului au un efect semnificativ ($p < 0,05$) în model. Efectul marginal semnificativ ($p = 0,099$) din punct de vedere statistic al variabilei nizină poate fi explicat de testarea, în cadrul studiilor experimentale, a unei singure concentrații de nizină, respectiv concentrația maximă admisă în produsele din carne. Cu toate acestea, procedura de analiză pas cu pas *backward*, care testează importanța fiecărei variabile din sistem, a indicat faptul că înlăturarea variabilei nizină nu îmbunătățește semnificativ capacitatea de predicționare a modelului. Conform testului statistic Hosmer–Lemeshow, există o bună fitare a datelor experimentale pe model ($p = 0,995$), procentul general privind predicțiile corecte fiind de 88,9%.

Tabelul 6.3. Parametrii utilizați în modelul de regresie logistică care prezice probabilitatea de recuperare a *L. monocytogenes* pe șunca de Praga tratată la presiuni înalte, în absența sau prezența nizinei, pe durata depozitării la 4°C

Parametru	Valoare estimată	SE	<i>p</i>
Intercept	3,627	2,272	0,110
Presiune	-0,018	0,007	0,012
Nizină	-0,116	0,070	0,099
Depozitare	0,356	0,167	0,033

Presiune = Presiunea înaltă aplicată (MPa); Nizină = Cantitatea de nizină adăugată (mg/kg); Depozitare = Perioada de depozitare a produsului la 4°C (zile); Hosmer–Lemeshow goodness-of-fit ($p = 0,995$); Concordanță = 88,9%;

Predicțiile privind probabilitatea de recuperare a *L. monocytogenes* pe șunca de Praga, în funcție de tratamentul la presiune înaltă aplicat, cantitatea de nizină adăugată și perioada de depozitare la 4°C, calculate prin aplicarea **Ecuției 6.1**, sunt prezentate în **Figura 6.4**.

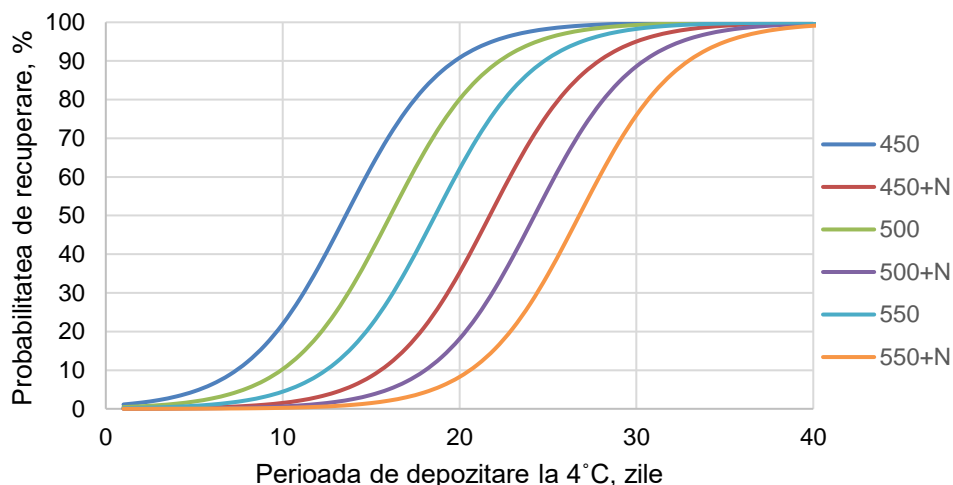


Figura 6.4. Predicțiile modelului de regresie logistică dezvoltat privind probabilitatea de recuperare a *L. monocytogenes* pe durata depozitării șuncii de Praga tratată la 450-550 MPa, timp de 3 min, în absența sau prezența nizină (N; 25 mg/kg), la 4°C

Modelul de regresie logistică obținut a fost aplicat pentru estimarea timpului necesar bacteriei patogene să se recupereze pe produsul din carne procesat și depozitat la temperatura de 4°C, în cazul aplicării unor tratamente la presiuni înalte din domeniul 450 – 550 MPa, cu sau fără nizină. Conform estimărilor calculate, o probabilitate de ~ 50% ca *L. monocytogenes* să se recupereze după tratamentele la 450, 500 și 550 MPa, timp de 3 min, apare după depozitarea în condiții de refrigerare a produsului procesat timp de ~ 13, 15, respectiv 18 zile. Combinarea tratamentelor la presiuni înalte cu adaosul de nizină (25 mg/kg) prelungește timpul necesar *L. monocytogenes* să se recupereze cu ~ 8 zile.

Concluzii

- Testarea rezistenței la presiune înaltă (400 MPa, RT, 1 min), a 10 tulpini de *L. monocytogenes* izolate din produse alimentare sau mediul de procesare a alimentelor, a indicat tulpina RO15 ca având cea mai ridicată barotoleranță. Tulpina selectată a indicat, de asemenea, rezistență la nizină;
- Adăugarea de nizină (25 mg/kg), ca obstacol suplimentar, permite reducerea nivelului de presiune înaltă la 500 MPa, fără a compromite siguranța produsului din carne, pe durata depozitării la 4°C, timp de 21 de zile;
- Aplicarea tehnologiei obstacolelor poate constitui o strategie de reducere a costurilor asociate procesului de tratare la presiuni înalte din mediul industrial, având în vedere posibilitatea reducerii nivelului de presiune înaltă, fără a compromite siguranța produselor alimentare;
- A fost dezvoltat un model de regresie logistică, care poate fi utilizat în estimarea probabilității de recuperare a *L. monocytogenes* pe produse din carne RTE, în funcție de tratamentul la presiune înaltă aplicat, adaosul de nizină și perioada de depozitare a acestora în condiții de refrigerare.

Concluzii finale

Studiul documentar al tezei a reliefat că *L. monocytogenes* este o bacterie patogenă capabilă să activeze diverse mecanisme pentru a rezista la factorii de stres asociați cu procesarea alimentelor, atât tradițională, cât și alternativă, ceea ce poate compromite siguranța produselor alimentare. Prin urmare, obiectivul principal al studiilor experimentale din prezenta teză de doctorat a constat în evidențierea unor mecanisme moleculare implicate în rezistența *L. monocytogenes* la tratamentul la presiuni înalte, o tehnologie alternativă din ce în ce mai prezentă în mediul industrial.

Prezenta cercetare constituie o abordare originală și complexă a problematicii reprezentate de abilitatea bacteriei patogene *L. monocytogenes* de a rezista la tratamentul la presiuni înalte, concluziile finale constând în următoarele:

- În sprijinul obiectivului principal al tezei de doctorat, a fost necesară deleția genelor țintă, *Imo1013*, respectiv *Imo2229*, din genomul tulpinii model *L. monocytogenes* EGDe, etapă experimentală realizată cu succes prin utilizarea sistemului lactococic format din vectorii plasmidiali *pORI280* și *pVE6007*, adaptat pentru eliminarea dirijată a acestora;
- Prin caracterizarea fenotipică a tulpinilor de *L. monocytogenes* mutante construite, a fost evidențiat rolul proteinelor codificate de genele țintă, *Imo1013* și *Imo2229*, în dinamica de creștere a celulelor listeriale, morfologia, motilitatea și capacitatea acestora de forma biofilm:
 - Cu toate că proteina de legare a penicilinei (PBP) A2, codificată de gena *Imo2229*, este dispensabilă viabilității celulelor de *L. monocytogenes*, existând posibilitatea ca funcția acesteia să fie compensată, în mutant, prin supraexprimarea unei alte proteine cu activitate similară, precum PBP A1 (codificată de gena *Imo1892*), eliminarea acesteia afectează creșterea celulelor;
 - Dinamica de creștere diferită a tulpinii mutante *L. monocytogenes* EGDe Δ *Imo2229* poate fi atribuită morfologiei anormale a celulelor, aceste având tendința de a forma filamente, ca urmare a unui dezechilibru privind coordonarea proceselor de alungire și septare a celulelor;
 - Sensibilitatea mai mare a celulelor muntate Δ *Imo1013*, intrate în fază de creștere staționară, indică importanța canalelor ionice mecanosenzitive în procesele fiziologice asociate acestei etape, după cum a fost observat și în cazul altor specii de bacterii;
 - La afirmația anterioară poate contribui morfologia celulelor mutante Δ *Imo1013*, care prezintă un diametru mai mare comparativ cu cel al celulelor de tip sălbatic;
 - Rezultatele studiului fenotipic au evidențiat că deleția genei codificatoare a PBP A2, *Imo2229*, afectează semnificativ motilitatea *L. monocytogenes*. Cu toate acestea, prin eliminarea genei s-a arătat că rolul proteinei codificate nu este unul important în ceea ce privește capacitatea patogenului de a forma biofilm;

- Deleția genei codificatoare a canalelor ionice mecanosenzitive de conductanță mică, *Imo1013*, a influențat într-o măsură mică, dar semnificativă, motilitatea *L. monocytogenes*. Deși literatura de specialitate discută posibilul rol pe care îl au canalele mecanosenzitive în procesul de formare a biofilmului, experimentele pe celulele de *L. monocytogenes* EGDe $\Delta Imo1013$ nu au reliefat o contribuție la acest fenotip.
- Testarea, în comparație cu tulpina sălbatică, a rezistenței tulpinilor mutante construite, *L. monocytogenes* EGDe $\Delta Imo1013$ și *L. monocytogenes* EGDe $\Delta Imo2229$, la presiuni înalte a reliefat următoarele aspecte:
 - Rolul canalelor ionice mecanosenzitive de conductanță mică în rezistența celulelor de *L. monocytogenes* sub efectul presiunilor înalte nu este unul semnificativ. Responsabile, într-o mai mare măsură, cu rezistența listeriilor la HPP ar putea fi canalele ionice mecanosenzitive de conductanță mare;
 - PBP A2 contribuie la unul dintre mecanismele de recuperare a celulelor de *L. monocytogenes* după expunere la presiuni înalte, care constă în repararea peretelui celular ca urmare a leziunilor cauzate de HPP. În acest context, inhibarea biosintezei peptidoglicanului reprezintă o strategie promițătoare de prevenire a recuperării listeriilor după procesarea la presiuni înalte.
- Rezultatele privind rezistența tulpinii mutante *L. monocytogenes* EGDe $\Delta Imo1013$ la stresul osmotic sau nizină nu au indicat un rol important al canalelor ionice mecanosenzitive de conductanță mică în toleranța bacteriei la aceste tipuri de stres.
- S-a evidențiat, pe de altă parte, importanța PBP A2 în rezistența *L. monocytogenes* la stresul hiperosmotic acut, fiind sugerată contribuția proteinei la mecanismul de osmotoleranță a bacteriei.
- Rezistența mult mai scăzută a tulpinii mutante *L. monocytogenes* EGDe $\Delta Imo2229$ la nizină, față de cea a tulpinii sălbatică, indică PBP A2 drept element important în mecanismul de rezistență a bacteriei la această peptidă antimicrobiană, după cum s-a observat și în cazul altor tulpini listeriale.
- Rezultatele privind efectul combinat al procesării la presiuni înalte și nizină indică tratamentul la 500 MPa, 8°C, 3 min, aplicat în prezența nizinei la o concentrație de 25 mg/kg, drept o bună alternativă și, posibil, mai puțin costisitoare la regimul de lucru adoptat de industria alimentară.
- Modelul de regresie logistică dezvoltat poate constitui un instrument util în estimarea perioadei de valabilitate a produselor din carne gata pentru consum și a condițiilor de procesare optime, având în vedere posibilitatea predicției recuperării bacteriei patogene *L. monocytogenes*.

Contribuții originale

Rezultatele prezentei teze de doctorat contribuie la extinderea cunoașterii în domeniul abordat, respectiv rezistența bacteriei patogene *L. monocytogenes* la condiții de stres asociate cu industria alimentară, prin următoarele aspecte:

- Sintetizarea cercetărilor de actualitate cu privire la rezistența *L. monocytogenes* la factorii de stres asociați cu metode tradiționale sau neconvenționale de procesare a alimentelor, pentru o înțelegere aprofundată a mecanismelor de supraviețuire utilizate de bacterie, care să ajute specialiștii din industria alimentară în aplicarea de strategii eficiente în combaterea patogenului;
- Contribuția la dezvoltarea unei metode de mutagenză situs-direcționată, bazată pe sistemul lactococic format din vectorii plasmidiali *pORI280* și *pVE6007*, ce poate fi aplicată cu succes în deleția genelor neesențiale din genomul *L. monocytogenes* sau al altor bacterii. Metoda constituie un instrument de editare genetică util în studiul mecanismelor de rezistență a *L. monocytogenes*;
- Aducerea de noi informații cu privire la rolul proteinelor codificate de genele țintă, *Imo1013* și *Imo2229*, în fiziologia și morfologia celulelor de *L. monocytogenes*;
- Contribuția la extinderea cunoașterii privind mecanismele activate de *L. monocytogenes* în urma tratării la presiuni înalte, pentru a supraviețui, și rezistența bacteriei la alți factori de stres pe care îi poate întâlni în matricea alimentară, precum stresul osmotic și bacteriocine (nizina);
- Identificarea unei posibile alternative la tratamentul la presiune înaltă utilizat de industrie, prin aplicarea tehnologiei obstacolelor;
- Dezvoltarea unui model predictiv bazat pe regresie logistică, care poate estima probabilitatea de recuperare a bacteriei patogene *L. monocytogenes* pe produse din carne gata pentru consum tratate la diferite combinații de presiune înaltă și nizină, pe durata depozitării în condiții de refrigerare;
- Prezenta teză de doctorat oferă noi direcții de cercetare privind rezistența *L. monocytogenes* la presiunile înalte și alți factori de stres întâmpinați de bacterie în industria alimentară, astfel încât să poată fi redusă incidența listeriozei cauzate de consumul de produse alimentare contaminate.

Perspective de continuare a cercetării

- Investigarea, la nivel transcriptomic, a efectului presiunilor înalte asupra tulpinilor de *L. monocytogenes* mutante construite, în vederea determinării genelor exprimate pentru a compensa funcția proteinelor codificate de genele deletate;
- Analiza biochimică a peretelui celular, în cazul celulelor de *L. monocytogenes* EGDe Δ *Imo2229*;

- Deleția sau, în funcție de rolul în viabilitatea celulară, represia prin CRISPRi, a altor gene posibil implicate în rezistența bacteriei la presiuni înalte, precum gena *Imo2064* (codificatoare a canalelor ionice mecanosensibile de conductanță mare), genele *clp* (codificatoare de proteaze cu rol în degradarea proteinelor denaturate), genele heat-shock din clasa I (codificatoare de chaperoni) și genele cold-shock (codificatoare de chaperoni ai ARN-ului);
- Caracterizarea tulpinilor mutante nou construite și testarea rezistenței acestora la presiuni înalte și alți factori de stres asociați cu produsele alimentare și mediul de procesare a alimentelor;
- Combinarea tratamentului la presiuni înalte cu utilizarea de bacteriofagi, ca strategie de eliminare a *L. monocytogenes* din produsele alimentare.

Bibliografie selectivă

- [1] Bachin, D., Nazarenko, L. V., Mironov, K. S., Pisareva, T., Allakhverdiev, S. I., Los, D. A. (2015). Mechanosensitive ion channel MscL controls ionic fluxes during cold and heat stress in *Synechocystis*. *FEMS Microbiology Letters*, 362, 2015, fnv090. doi: 10.1093/femsle/fnv090
- [2] Barbosa, J., Borges, S., Camilo, R., Magalhães, R., Ferreira, V., Santos, I., et al. (2013). Biofilm formation among clinical and food isolates of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Microbiology*, 2013, 1–6. doi: 10.1155/2013/524975
- [3] Bergholz, T. M., Bowen, B., Wiedmann, M., Boor, K. J. (2012). *Listeria monocytogenes* shows temperature-dependent and -independent responses to salt stress, including responses that induce cross-protection against other stresses. *Applied and Environmental Microbiology*, 78:8, 2602–2612. doi: 10.1128/aem.07658-11
- [4] Borucki, M. K., Peppin, J. D., White, D., Loge, F., Call, D. R. (2003). Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology*, 69:12, 7336–7342. doi: 10.1128/aem.69.12.7336-7342.2003
- [5] Bowman, J. P., Bittencourt, C. R., Ross, T. (2008). Differential gene expression of *Listeria monocytogenes* during high hydrostatic pressure processing. *Microbiology*, 154:2, 462–475. doi: 10.1099/mic.0.2007/010314-0
- [6] Briandet, R., Meylheuc, T., Maher, C., Bellon-Fontaine, M. N. (1999). *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:12, 5328–5333.
- [7] Burall, L. S., Simpson, A. C., Chou, L., Laksanalamai, P., Datta, A. R. (2015). A novel gene, *IstC*, of *Listeria monocytogenes* is implicated in high salt tolerance. *Food Microbiology*, 48, 72–82. doi:10.1016/j.fm.2014.12.008
- [8] Chen, H., Neetoo, H., Ye, M., Joerger, R. D. (2009). Differences in pressure tolerance of *Listeria monocytogenes* strains are not correlated with other stress tolerances and are not based on differences in CtsR. *Food Microbiology*, 26:4, 404–408. doi: 10.1016/j.fm.2009.01.007
- [9] Chung, Y. - K., Vurma, M., Turek, E. J., Chism, G. W., Yousef, A. E. (2005). Inactivation of barotolerant *Listeria monocytogenes* in sausage by combination of high-pressure processing and food-grade additives. *Journal of Food Protection*, 68:4, 744-750. doi: 10.4315/0362-028X-68.4.744
- [10] Ciolacu, L., Nicolau, A. I., Wagner, M., Rychli, K. (2015). *Listeria monocytogenes* isolated from food samples from a Romanian black market show distinct virulence profiles. *International Journal of Food Microbiology*, 209, 44–51. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.035
- [11] Collins, B., Guinane, C. M., Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. (2012). Assessing the contributions of the LiaS histidine kinase to the innate resistance of *Listeria monocytogenes* to nisin, cephalosporins,

- and disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology*, 78:8, 2923–2929. doi: 10.1128/aem.07402-11
- [12] Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Paludi, D., D’Orio, V., Vergara, A., Conter, M. *et al.* (2008). Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*, 104:6, 1552–1561. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03688.x
- [13] Doijad, S. P., Barbudde, S. B., Garg, S., Poharkar, K. V., Kalorey, D. R., Kurkure, N. V. *et al.* (2015). Biofilm-forming abilities of *Listeria monocytogenes* serotypes isolated from different sources. *PLoS ONE*, 10:9, e0137046. doi: 10.1371/journal.pone.0137046
- [14] Durack, J., Burke, T. P., Portnoy, D. A. (2014). A *prl* mutation in SecY suppresses secretion and virulence defects of *Listeria monocytogenes* *secA2* mutants. *Journal of Bacteriology*, 197:5, 932–942. doi: 10.1128/jb.02284-14
- [15] Durack, J., Ross, T., Bowman, J. P. (2013). Characterisation of the transcriptomes of genetically diverse *Listeria monocytogenes* exposed to hyperosmotic and low temperature conditions reveal global stress-adaptation mechanisms. *PloS ONE*, 8:9, e73603. doi: 10.1371/journal.pone.0073603
- [16] EFSA (European Food Safety Authority) (2018). Scientific Opinion on the *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA Journal*, 16:1, 5134-5307. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5134
- [17] Ferreira, M., Almeida, A., Delgado, I., Saraiva, J., Cunha, Â. (2016). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* to high pressure processing: A review. *Food Reviews International*, 32:4, 377–399. doi: 10.1080/87559129.2015.1094816
- [18] Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F. *et al.* (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science*, 294:5543, 849-852. doi: 10.1126/science.1063447
- [19] Gravesen, A., Kallipolitis, B., Holmstrom, K., Hoiby, P. E., Ramnath, M., Knochel, S. (2004). *pbp2229*-mediated nisin resistance mechanism in *Listeria monocytogenes* confers cross-protection to class IIa bacteriocins and affects virulence gene expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:3, 1669–1679. doi: 10.1128/aem.70.3.1669-1679.2004
- [20] Guinane, C. M., Cotter, P. D., Ross, R. P., Hill, C. (2006). Contribution of penicillin-binding protein homologs to antibiotic resistance, cell morphology, and virulence of *Listeria monocytogenes* EGDe. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50:8, 2824–2828. doi: 10.1128/AAC.00167-06
- [21] Haenni, M., Majcherczyk, P. A., Barblan, J. L., Moreillon, P. (2006). Mutational analysis of class A and class B penicillin-binding proteins in *Streptococcus gordonii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50:12, 4062–4069. doi: 10.1128/AAC.00677-06
- [22] Hereu, A., Dalgaard, P., Garriga, M., Aymerich, T., Bover-Cid, S. (2012). Modeling the high pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* on RTE cooked meat products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 305–315. doi: 10.1016/j.ifset.2012.07.005
- [23] Hoffmann, T., Boiangiu, C., Moses, S., Bremer, E. (2008). Responses of *Bacillus subtilis* to hypotonic challenges: physiological contributions of mechanosensitive channels to cellular survival. *Applied and Environmental Microbiology*, 74:8, 2454–2460. doi: 10.1128/AEM.01573-07
- [24] Huang, H.-W., Lung, H.-M., Yang, B. B., Wang, C.-Y. (2014). Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing. *Food Control*, 40, 250–259. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.12.007
- [25] Karatzas, K. A. G., Bennik, M. H. J. (2002). Characterization of a *Listeria monocytogenes* Scott A isolate with high tolerance towards high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:7, 3183–3189. doi: 10.1128/aem.68.7.3183-3189.2002
- [26] Karatzas, K. A. G., Valdramidis, V. P., Wells-Bennik, M. H. J. (2005). Contingency locus in *ctsR* of *Listeria monocytogenes* Scott A: a strategy for occurrence of abundant piezotolerant isolates within clonal populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:12, 8390–8396. doi: 10.1128/aem.71.12.8390-8396.2005

- [27] Karatzas, K. A. G., Wouters, J. A., Gahan, C. G. M., Hill, C., Abee, T., Bennik, M. H. J. (2003). The CtsR regulator of *Listeria monocytogenes* contains a variant glycine repeat region that affects piezotolerance, stress resistance, motility and virulence. *Molecular Microbiology*, 49:5, 1227–1238. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03636.x
- [28] Kaval, K. G., Hahn, B., Tusamda, N., Albrecht, D., Halbedel, S. (2015). The PadR-like transcriptional regulator LftR ensures efficient invasion of *Listeria monocytogenes* into human host cells. *Frontiers in microbiology*, 6, 772. doi: 10.3389/fmicb.2015.00772
- [29] Kruger, E., Witt, E., Ohlmeier, S., Hanschke, R., Hecker, M. (2000). The Clp proteases of bacillus subtilis are directly involved in degradation of misfolded proteins. *Journal of Bacteriology*, 182:11, 3259–3265. doi: 10.1128/jb.182.11.3259-3265.2000
- [30] Lai, G. C., Cho, H., Bernhardt, T. G. (2017). The mecillinam resistome reveals a role for peptidoglycan endopeptidases in stimulating cell wall synthesis in *Escherichia coli*. *PLoS genetics*, 13:7, e1006934. doi:10.1371/journal.pgen.1006934
- [31] Landete, J. M. (2016). A review of food-grade vectors in lactic acid bacteria: from the laboratory to their application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37:3, 296–308. doi: 10.3109/07388551.2016.1144044
- [32] Leenhouts, K. (1996). A general system for generating unlabelled gene replacements in bacterial chromosomes. *Molecular and General Genetics*, 253:1-2, 217–224. doi: 10.1007/s004380050315
- [33] Little, C. L., Sagoo, S. K., Gillespie, I. A., Grant, K., McLauchlin, J. (2009). Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in selected retail ready-to-eat foods in the United Kingdom. *Journal of Food Protection*, 72:9)0, 1869–1877. doi: 10.4315/0362-028x-72.9.1869
- [34] Maguin, E., Duwat, P., Hege, T., Ehrlich, D, Gruss, A. (1992). New thermosensitive plasmid for Gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology*, 147:17, 5633-5638.
- [35] Manas, P., Mackey, B. M. (2004). Morphological and physiological changes induced by high hydrostatic pressure in exponential- and stationary-phase cells of *Escherichia coli*: relationship with cell death. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:3, 1545–1554. doi: 10.1128/aem.70.3.1545-1554.2004
- [36] Monk, I. R., Gahan, C.G., Hill, C. (2008). Tools for functional postgenomic analysis of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74:13, 3921-34. doi: 10.1128/AEM.00314-08
- [37] Moreirinha, C., Almeida, A., Saraiva, J. A., Delgadillo, I. (2016). High-pressure processing effects on foodborne bacteria by mid-infrared spectroscopy analysis. *LWT - Food Science and Technology*, 73, 212–218. doi: 10.1016/j.lwt.2016.05.041
- [38] Popham, D. L., Young, K. D. (2003). Role of penicillin-binding proteins in bacterial cell morphogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 6:6, 594–599. doi: 10.1016/j.mib.2003.10.002
- [39] Ritz, M., Tholozan, J. L., Federighi, M., Pilet, M. F. (2001). Morphological and physiological characterization of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:5, 2240–2247. doi: 10.1128/AEM.67.5.2240-2247.2001
- [40] Shen, A., Higgins, D. E. (2006). The MogR transcriptional repressor regulates nonhierarchical expression of flagellar motility genes and virulence in *Listeria monocytogenes*. *PLoS pathogens*, 2:4, e30. doi: 10.1371/journal.ppat.0020030
- [41] Sleator, R. D., Gahan, C. G. M., Hill, C. (2003). A postgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:1, 1–9. doi: 10.1128/aem.69.1.1-9.2003
- [42] Stokes, N. R., Murray, H. D., Subramaniam, C., Gourse, R. L., Louis, P., Bartlett, W. et al. (2003). A role for mechanosensitive channels in survival of stationary phase: regulation of channel expression by RpoS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100:26, 15959–15964. doi: 10.1073/pnas.2536607100
- [43] Tomoyasu, T., Mogk, A., Langen, H., Goloubinoff, P., Bukau, B. (2001). Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. *Molecular Microbiology*, 40:2, 397–413. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02383.x

- [44] van Boeijen, I. K. H., Chavarroche, A. A. E., Valderrama, W. B., Moezelaar, R., Zwietering, M. H., Abee, T. (2010). Population diversity of *Listeria monocytogenes* LO28: phenotypic and genotypic characterization of variants resistant to high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:7, 2225–2233. doi: 10.1128/aem.02434-09
- [45] Vigouroux, A., Cordier, B., Aristov, A., Alvarez, L., Özbaykal, G., Chaze, T., Oldewurtel, E. R., Matondo, M., Cava, F., Bikard, D., van Teeffelen, S. (2020). Class-A penicillin binding proteins do not contribute to cell shape but repair cell-wall defects. *eLife*, 9, e51998. doi: 10.7554/eLife.51998
- [46] Wen, J., Anantheswaran, R. C., Knabel, S. J. (2009). Changes in barotolerance, thermotolerance, and cellular morphology throughout the life cycle of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:6, 1581–1588. doi: 10.1128/aem.01942-08
- [47] Woldemariam, H. W., Emire, S. A. (2019). High pressure processing of foods for microbial and mycotoxins control: current trends and future prospects. *Cogent Food & Agriculture*, 5:1. doi: 10.1080/23311932.2019.1622184
- [48] Zawadzka-Skomial, J., Markiewicz, Z., Nguyen-Distèche, M., Devreese, B., Frère, J. M., Terrak, M. (2006). Characterization of the bifunctional glycosyltransferase/acyltransferase penicillin-binding protein 4 of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*, 188:5, 1875–1881. doi: 10.1128/JB.188.5.1875-1881.2006

Diseminarea rezultatelor cercetării

Articole publicate în jurnale ISI

Bucur, F. I., Grigore-Gurgu, L., Crauwels, P., Riedel, C. U., Nicolau, A. I. (2018). Resistance of *Listeria monocytogenes* to stress conditions encountered in food and food processing environments. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2700. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02700>.
Factor de impact: 4,272

Zetzmann, M., **Bucur, F. I.**, Crauwels, P., Borda, D., Nicolau A. I., Grigore-Gurgu, L., Seibold, G. M., Riedel, C. U. (2019). Characterization of the biofilm phenotype of a *Listeria monocytogenes* mutant deficient in *agr* peptide sensing. *MicrobiologyOpen*, 8:e826. <https://doi.org/10.1002/mbo3.826>. **Factor de impact: 2,71**

Duru, I. C., Andreevskaya, M., Laine, P., Rode, T. M., Ylinen, A., Løvdal, T., Bar, N., Crauwels, P., Riedel, C. U., **Bucur, F. I.**, Nicolau, A. I., Auvinen, P. (2020). Genomic characterization of the most barotolerant *Listeria monocytogenes* RO15 strain compared to reference strains used to evaluate food high pressure processing. *BMC Genomics*, 21:1, 455. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06819-0>. **Factor de impact: 3,527**

Articole publicate în jurnale BDI

Bucur, F. I., Borda, D., Nicolau, A. I., Grigore-Gurgu, L. (2020). Assessment of *L. monocytogenes* cells' capacity to recover in cucumber juice after high pressure treatment. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI – FOOD TECHNOLOGY*, 44:1. <https://doi.org/10.35219/foodtechnology.2020.1.03>

Articole în recenzie la data susținerii tezei de doctorat

Duru, I. C.**, **Bucur, F. I.****, Andreevskaya, M.**, Nikparvar, B., Ylinen, A., Grigore-Gurgu, L., Rode, T. M., Crauwels, P., Laine, P., Paulin, P., Løvdal, T., Riedel, C. U., Bar, N., Borda, D.***, Nicolau, A. I.***, Auvinen, P.***. HPP-induced transcriptome response during recovery of *Listeria monocytogenes*. (**Primii autori; ***Ultimii autori) – *BMC Genomics* **Factor de impact: 3,527**

Conferințe internaționale

Crauwels, P., Zetzmann, M., Seow, M., **Bucur, F. I.**, Schäfer, L., Chandramohan, R., Nicolau, A., Riedel, C. Towards a functional CRISPRi system for *Listeria monocytogenes*. **Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology**, 15-18.04.2018, Wolfsburg, Germania

Grigore-Gurgu, L., **Bucur, F. I.**, Nicolau, A. I. Progresses in biotechnology supported by CRISPR/Cas based-technology. **Conferința Internațională Anuală a Societății Române de Biochimie și Biologie Moleculară**, 5-7.09.2018, București, România

Ribeiro, T. G., **Bucur, F. I.**, Borda, D., Novais, C., Antunes, P., Nicolau, A. I., Bar, N. Peixe, L. Multiple molecular components of *Listeria monocytogenes* affected by high pressure processing treatments: Fourier transform-infrared spectroscopy insights. **FEMS Congress**, 7-11.07.2019, Glasgow, Scoția

Grigore-Gurgu, L., Duru, I. C., Andreevskaya, M., Ylinen, A., **Bucur, F. I.**, Borda, D., Auvinen, P., Nicolau, A. I. From gene sequencing to proteins expression in high pressure treated *Listeria monocytogenes*. **International Symposium EuroAliment-Innovative Minds for Future Food**, 5-6.09.2019, Galați, România

Conferințe naționale cu participare internațională

Bucur F. I., Grigore-Gurgu, L., Nicolau, A. I. Survival mechanisms of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. **Conferința Științifică a Școlilor Doctorale CSSD-UDJG**, ediția a 5-a, 8-9.06.2017, Galați, România

Bucur, F. I., Grigore Gurgu, L., Nicolau, A.I. Applying CRISPRi system in baroresistant *Listeria monocytogenes* strains. **Scientific Conference Of Doctoral Schools - Perspectives and challenges in doctoral research**, ediția a 6-a, 7-8.06.2018, Galați, România

Bucur, F. I., Grigore-Gurgu, L., Borda, D., Nicolau, A. I. *Listeria monocytogenes* survival and recovery capacity in cucumber juice after high pressure treatment. **Scientific Conference Of Doctoral Schools - Perspectives and challenges in doctoral research**, ediția a 7-a, 13-14.06.2019, Galați, România

Bucur, F. I., Grigore-Gurgu, L., Borda, D., Nicolau, A. I. Assessment of *Listeria monocytogenes* resistance to food processing techniques and its capacity to form biofilm. **Scientific Conference Of Doctoral Schools - Perspectives and challenges in doctoral research**, ediția a 8-a, 18-19.06.2020, Galați, România

Grigore-Gurgu, L., **Bucur, F. I.** CRISPR – CAS9 mediated genome editing, a cutting-edge tool for microbial metabolic engineering. **Multidisciplinary Conference on Sustainable**

Development - Section: Food Chemistry, Engineering & Technology, 8-9.10.2020, Timișoara, România

Premii

Premiul III pentru prezentarea orală a lucrării **Bucur F. I.**, Grigore-Gurgu, L., Nicolau, A. I. "Survival mechanisms of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*" în cadrul celei de-a 5-a ediții a **SCDS - UDJG - Perspectives and challenges in doctoral research**, 8-9.06.2017, Galați, România.

Premiul I pentru prezentarea orală a lucrării **Bucur, F. I.**, Grigore Gurgu, L., Nicolau, A.I. "Applying CRISPRi system in baroresistant *Listeria monocytogenes* strains" în cadrul celei de-a 6-a ediții a **SCDS - UDJG - Perspectives and challenges in doctoral research**, 7-8.06.2018, Galați, România.

Premiul I pentru prezentarea orală a lucrării **Bucur, F. I.**, Grigore-Gurgu, L., Borda, D., Nicolau, A. I. "*Listeria monocytogenes* survival and recovery capacity in cucumber juice after high pressure treatment" în cadrul celei de-a 7-a ediții a **SCDS - UDJG - Perspectives and challenges in doctoral research**, 13-14.06.2019, Galați, România.

Premiul Prof. G. M. Costin instituit de prof. dr. ing. Carmen Moraru cu sprijinul Asociației Specialiștilor din Industria Laptelui din România pentru rezultatele cercetării prezentate la **SCDS - UDJG - Perspectives and challenges in doctoral research**, 13-14.06.2019, Galați, România.

Mențiuni pentru prezentarea posterului **Bucur, F. I.**, Grigore-Gurgu, L., Borda, D., Nicolau, A. I. "Assessment of *Listeria monocytogenes* resistance to food processing techniques and its capacity to form biofilm" în cadrul celei de-a 8-a ediții a **SCDS - UDJG - Perspectives and challenges in doctoral research**, 18-19.06.2020, Galați, România.

Proiecte de cercetare internaționale

26.01.2017-31.10.2019 - Proiectul internațional ERA NET/ ERA IB 2: „Development of a novel industrial process for safe, sustainable and higher quality foods” (**SafeFood**)

Stagii de cercetare

11.09.-25.11.2017 – Aplicarea tehnologiei CRISPRi și a mutagenzei situs-direcționate în vederea modificării genetice a bacteriei patogene *Listeria monocytogenes*. (Mobilitate finanțată de proiectul SafeFood - Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, Universitatea din Ulm, Ulm, Germania)

Workshop-uri naționale și internaționale

„Completion of the Next-Generation Scientists” organizat de Illumina & ELTA 90 cu privire la Pregătirea librăriilor, Secvențiere și Tehnici de Bioinformatică. 26.03.2019, Pravets, Bulgaria.

„PhageUgal Summer School” organizată de Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor de Universitatea Dunărea de Jos din Galați în parteneriat cu APC Microbiome Ireland, 16-19.07.2019, Galați, România.

Alte activități asociate perioadei de studii doctorale

Capitole de carte

Grigore-Gurgu, L., **Bucur, F. I.**, Borda, D., Alexa, E.-A., Neagu, C., Nicolau, A. I. (2019). Biofilms formed by pathogens in food and food processing environments. În *Bacterial Biofilms*, IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.90176>

Articole științifice

Mihalcea, L., **Bucur, F. I.**, Cantaragiu, A. M., Gurgu, L., Borda, D., Iordăchescu, G. (2016). Temperature influence on the *Agaricus bisporus* mushrooms dehydration process. *Scientific Study & Research: Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 17:4, 323-333. ISSN 1582-540X

Conferințe

Oniciuc, E. A., **Bucur, F. I.**, Rodríguez-Lázaro, D., Barbu, V., Hernández, M., Nicolau, A. I. Correlation between biofilm formation and composition and molecular aspects of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **FEMS Congress**, 9-13.07.2017, Valencia, Spania

Bucur, F. I., Mihalache, O. A., Neagu, C., Nicolau, A. I. Faith of salmonellae in mayonaisse during storage under improper refrigeration or refrigeration combined with occasional storage at room temperature. **International Symposium EuroAliment-Innovative Minds for Future Food**, 5-6.09.2019, Galați, România

Proiecte

08.06.2017 – Prezent Proiectul internațional H2020: „Safer food through changed consumer behaviour: Effective tools and products, communication strategies, education and food safety policy reducing health burden from foodborne illnesses” (SafeConsume)

10.09.2019 – Prezent Burse pentru educația antreprenorială în rândul doctoranzilor și cercetătorilor postdoctorat (Be Antreprenor!)

Premii

Obținerea medaliei de aur la Concursul Internațional de Creație Studențească „ECOTROPHELIA”, faza internațională (2018), prin coordonarea echipei Whey4Fun, participantă la concurs cu produsul Whoopie Ice (Paris, Franța)

Premiul I pentru rezultatele obținute la Competiția Națională pentru Conștientizarea și Dezvoltarea Spiritului Antreprenorial – PORTUL ANTREPRENORIAL, desfășurată la Galați, în perioada 30.10.-1.11.2018.