

DYNAMIKA TWORZENIA BIOFILMU *LISTERIA MONOCYTOGENES* NA POWIERZCHNI POLIPROPYLENU W OBECNOŚCI DROBNOUSTROJÓW NATYWNYCH ŚRODOWISKA PRODUKCJI ŻYWNOŚCI

Joanna Królasik, Anna Szosland-Faltyn

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Wacława Dąbrowskiego

Zakład Jakości Żywności

Al. marsz. J. Piłsudskiego 84, 92-202 Łódź

joanna.krolasik@ibprs.pl

Streszczenie

Listeria monocytogenes to jeden z najczęściej izolowanych drobnoustrojów chorobotwórczych, zarówno z produktów spożywczych, jak i ze środowiska produkcyjnego. Liczne szczepy należące do tego gatunku są stale obecne w środowisku zakładów przetwórstwa żywności, co może wynikać z ich zdolności do tworzenia biofilmów.

Celem badań była ocena dynamiki formowania biofilmu na powierzchni polipropylenu przez dwa patogenne szczepy *Listeria monocytogenes* w obecności drobnoustrojów *Micrococcus luteus* i *Pseudomonas putida*

Adhezja komórek *Listeria monocytogenes* do powierzchni polipropylenu zachodziła szybciej i efektywniej w obecności drobnoustrojów natywnych środowiska produkcji żywności niż w czystej hodowli. Liczebność poszczególnych drobnoustrojów w biofilmach mieszanych była zmienna w czasie. Przeprowadzone badania dowodzą złożoności mechanizmów oddziaływań międzygatunkowych zachodzących w czasie tworzenia i funkcjonowania biofilmów, a ich dokładne poznanie jest konieczne do opracowania strategii skutecznego zwalczania tych struktur.

Słowa kluczowe: biofilm, *Listeria monocytogenes*, polipropylen

DYNAMICS OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* BIOFILM FORMATION ON POLYPROPYLENE SURFACE IN THE PRESENCE OF NATIVE MICROORGANISMS ISOLATED FOOD INDUSTRY ENVIRONMENT

Summary

Listeria monocytogenes is one of the most frequently isolated pathogens from the food products and the production environment. Many strains belonging to this species are always present in the environment of food processing plants, which may result from their ability to form biofilms.

The aim of this study was to assess the dynamics of the biofilm formation on the polypropylene surface by two pathogenic *Listeria monocytogenes* strains in the presence of microorganisms isolated from the food contact surfaces: *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas putida*.

Listeria monocytogenes cells adhesion to the polypropylene surface occurred faster and more efficiently in the presence of native microorganisms from food processing environment, than in pure culture. The number of individual microorganisms in mixed biofilms was variable in time. The study showed that mechanisms of interspecies interactions occurring during the biofilms formation and functioning are very complex and their detailed knowledge is necessary to develop a strategy to effectively destroying these structures.

Key words: biofilm, *Listeria monocytogenes*, polypropylene

WSTĘP

Tworzenie się biofilmów bakteryjnych na powierzchniach abiotycznych jest procesem ujawniającym się w wielu dziedzinach życia, obejmujących, między innymi: środowiska szpitalne, oczyszczalnie wody czy produkcję żywności. W praktyce medycznej jest on przyczyną zakażeń u pacjentów, u których stosowano przyrządy wykonane z materiałów syntetycznych (cewniki, dreny, protezy stawowe, soczewki kontaktowe). Adhezja drobnoustrojów występujących w jamie ustnej do powierzchni zębów powoduje powstawanie płytki nazębnej, próchnicy i paradontozy [Dwardzińska, Dworecka-Kaszak 2014, Pasich i in. 2013]. W przemyśle spożywczym biofilmy tworzące się na powierzchniach produkcyjnych stanowią bezpośrednie lub wtórne źródło zakażenia mikrobiologicznego żywności w czasie procesów produkcyjnych, zwłaszcza tych o długim czasie operacji technologicznych. Błony biologiczne mogą zawierać zarówno bakterie chorobotwórcze, np. *Salmonella* spp. czy *Listeria monocytogenes*, jak i drobnoustroje oportunistyczne (*Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*) wywołujące biegunki, które mogą być długotrwałe i trudne do leczenia, zwłaszcza u osób z obniżoną odpornością [Myszka, Czaczyk 2007]. Biofilmy będące źródłem drobnoustrojów obniżających jakość i trwałość żywności, a w konsekwencji powodujących jej zepsucie, są również przyczyną ogromnych strat ekonomicznych, ponoszonych każdego roku przez producentów [Berthold 2007].

Biofilmy to przestrzenne, wielokomórkowe struktury drobnoustrojów należących do jednego lub kilku gatunków, wykazujących zdolność przylegania do siebie nawzajem i do powierzchni stałych (biologicznych i abiotycznych), otoczone warstwą wytwarzanych przez siebie zewnątrzkomórkowych polimerów. Tworzą się one najczęściej w środowiskach wilgotnych i mogą być złożone z jednego, kilku lub nawet kilkunastu gatunków bakterii

czy grzybów, a w sprzyjających warunkach także z organizmów wyższych [Costerton i in. 1995; Czaczyk, Wojciechowska 2003]. Komórki bakteryjne w biofilmie rosną w postaci mikrokolonii, które są oddzielone od siebie kanałami wodnymi. W dojrzałym biofilmie woda stanowi około 60% całej objętości. Mikrokolonie występują głównie w peryferycznych częściach biofilmu, a tylko nieliczne umiejscowione są we wnętrzu błony biologicznej. Kanałami wodnymi, na zasadzie konwersji, rozprowadzane są substancje odżywcze, odprowadzane zaś wtórne produkty metabolizmu [Chmielewski, Frank 2003; Nikolaev, Plakunov 2007; Ploux i in. 2007]. Głównym komponentem błon biologicznych są pozakomórkowe substancje wytwarzane przez mikroorganizmy, tzw. EPS (ang. *Extracellular Polymeric Substances*), które wchłaniają wodę, wychwytyują znajdujące się w niej substancje odżywcze i utrzymują biofilm w całości. Zewnątrzkomórkowe biopolimery tworzą ochronną warstwę śluzu, która zwiększa wytrzymałość drobnoustrojów na działanie środków przeciwdrobnoustrojowych i innych szkodliwych czynników, a mechanizm tego zjawiska wyjaśnia się między innymi wolniejszą dyfuzją biocydów przez matrycę EPS [Costerton 1999; Baker i in. 2010].

Jednym z patogenów najczęściej izolowanych, zarówno z produktów spożywczych, jak i środowiska produkcyjnego, jest *Listeria monocytogenes*. Stanowi ona przyczynę około 2500 poważnych chorób oraz 500 zgonów rocznie [Koo i in. 2012]. W wielu badaniach wykazano, że liczne szczepy *Listeria monocytogenes* są stale obecne w środowisku zakładów przetwórstwa żywności, a skażenie produktów spożywczych tym patogenem w przeważającej mierze jest wynikiem zakażeń krzyżowych [Van der Veen, Abee 2011]. Przyczyny takiego stanu upatruje się w zdolności tych bakterii do tworzenia biofilmu na urządzeniach i sprzęcie produkcyjnym. W takiej postaci niektóre szczepy *Listeria monocytogenes* są w stanie przetrwać na różnych powierzchniach przez miesiące, a nawet lata [Costerton i in. 1995]. Zdolność *Listeria monocytogenes* do tworzenia biofilmów potwierdzili między innymi Amalaradjou i in. [2009], Ayebah i in. [2005], Bremer i in. [2001], Carpentier, Chassaing [2004]. Wykazano również, że drobnoustroje patogenne o wiele łatwiej tworzą biofilmy heterogenne (wielogatunkowe), np. z *Pseudomonas* sp. czy *Listeria innocua*, niż jednogatunkowe [Carpentier, Chassaing 2004; Zottola, Sasahara 1994]. Większość dotychczasowych badań nad biofilmem *Listeria monocytogenes* skupiała się jednak na określeniu dynamiki tworzenia się tej struktury w różnych warunkach temperatury i dostępności składników odżywczych oraz ocenie oporności biofilmu na biocydy, w odniesieniu do pojedynczych szczepów tego gatunku bakterii.

Pomimo, że badania biofilmów prowadzone są od ponad 30 lat, to nadal w niedostatecznym stopniu poznane są interakcje zachodzące pomiędzy drobnoustrojami w wielogatunkowych konsorcjach. Dlatego też, wielu badaczy zwraca uwagę na potrzebę badań własności biofilmów utworzonych z dwóch lub więcej gatunków drobnoustrojów. Podkreśla się również, że dobrze znane właściwości jednogatunkowych biofilmów, takie jak: powolny wzrost, wysoka gęstość komórek tworzących struktury przestrzenne, a także różnorodność przemian chemicznych w poszczególnych mikrośrodkach, mogą nie występować w biofilmach wielogatunkowych. Ponadto komunikacja międzykomórkowa z wykorzystaniem systemów *quorum sensing*, za pomocą których regulowane są procesy takie jak: bioluminescencja, wirulencja, kompetencja, koniugacja, sporulacja, synteza antybiotyków, ruchliwość czy tworzenie biofilmu, może przebiegać w odmienny sposób w biofilmach wielogatunkowych, w porównaniu do stosunkowo dobrze poznanego przebiegu tego zjawiska w biofilmach jednogatunkowych [Karunakaran i in. 2011; Kołwzan 2012; Trafny 2012b]. Prowadzenie badań zmierzających do określenia udziału poszczególnych gatunków bakterii oraz zachodzących między nimi interakcji, mogących prowadzić do zwiększenia ich oporności na czynniki antimikrobiologiczne, ma bardzo istotne znaczenie. Pozwolą one bowiem na wyjaśnienie wielu zjawisk zachodzących w środowiskach produkcyjnych oraz podczas rozwoju nawracających zakażeń, które zwykle przebiegają z udziałem wielogatunkowych biofilmów [Trafny 2012a]. Mając na uwadze potrzebę badań własności biofilmów złożonych z więcej niż jednego gatunku mikroorganizmów, w prezentowanej pracy podjęto badania mające na celu określenie dynamiki tworzenia się biofilmu *Listeria monocytogenes* na powierzchni polipropylenu w obecności drobnoustrojów natywnych środowiska produkcji żywności. Na podstawie uzyskanych wyników i doniesień literaturowych podjęto próbę wskazania prawdopodobnych wzajemnych oddziaływań zachodzących pomiędzy badanymi drobnoustrojami w biofilmach mieszanych.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiał biologiczny stanowiły cztery szczepy bakterii: dwa patogenne szczepy *Listeria monocytogenes* (szczep wzorcowy ATCC 19111 i wyizolowany z żywności) oraz dwa drobnoustroje oportunistyczne: *Pseudomonas putida*, *Micrococcus luteus*, wyizolowane z powierzchni produkcyjnych kontaktujących się z żywnością. Do utworzenia biofilmu wykorzystano polipropylen, a hodowlę prowadzono w warunkach łagodnego ruchu pożywki. Do jałowych naczyń z polipropylenu (płytki Petriego o średnicy 90 mm) наносzono po 1 ml wystandaryzowanej zawiesiny drobnoustrojów, zawierającej 10^6 jtk/ml i 9 ml pożywki TSB

rozcieńczonej dziesięciokrotnie. Hodowle prowadzono na wytrząsarce, przy 50 obr/min, w temperaturze 20°C przez 7 dni (168 h). W trakcie prowadzenia hodowli, po każdych 48 godzinach inkubacji badane powierzchnie abiotyczne przemywano jałową wodą destylowaną z zachowaniem warunków aseptycznych, a następnie do szalek наносono 9 ml świeżego podłoża płynnego. Czynność ta miała na celu usunięcie komórek planktonicznych i zachowanie rosnących bakterii tylko na badanych płaszczyznach. Po 7 dniach (168 h) inkubacji pobierano wymazy przy użyciu jałowych tamponów, które umieszczano w butelkach zawierających płyn płuczący i wytrząsano przez 1 minutę. Po przygotowaniu serii dziesięciokrotnych rozcieńczeń wykonano posiew na płytki z odpowiednim podłożem stałym: TSA, ALOA, ANC. Posiewy inkubowano w temperaturze 30°C lub 37°C przez 48 do 72 godzin. Liczbę drobnoustrojów na całej powierzchni badanej (63,5 cm²) obliczono według wzoru:

$$L = a \times b$$

gdzie: a – liczba drobnoustrojów w 1 ml zawiesiny wyjściowej

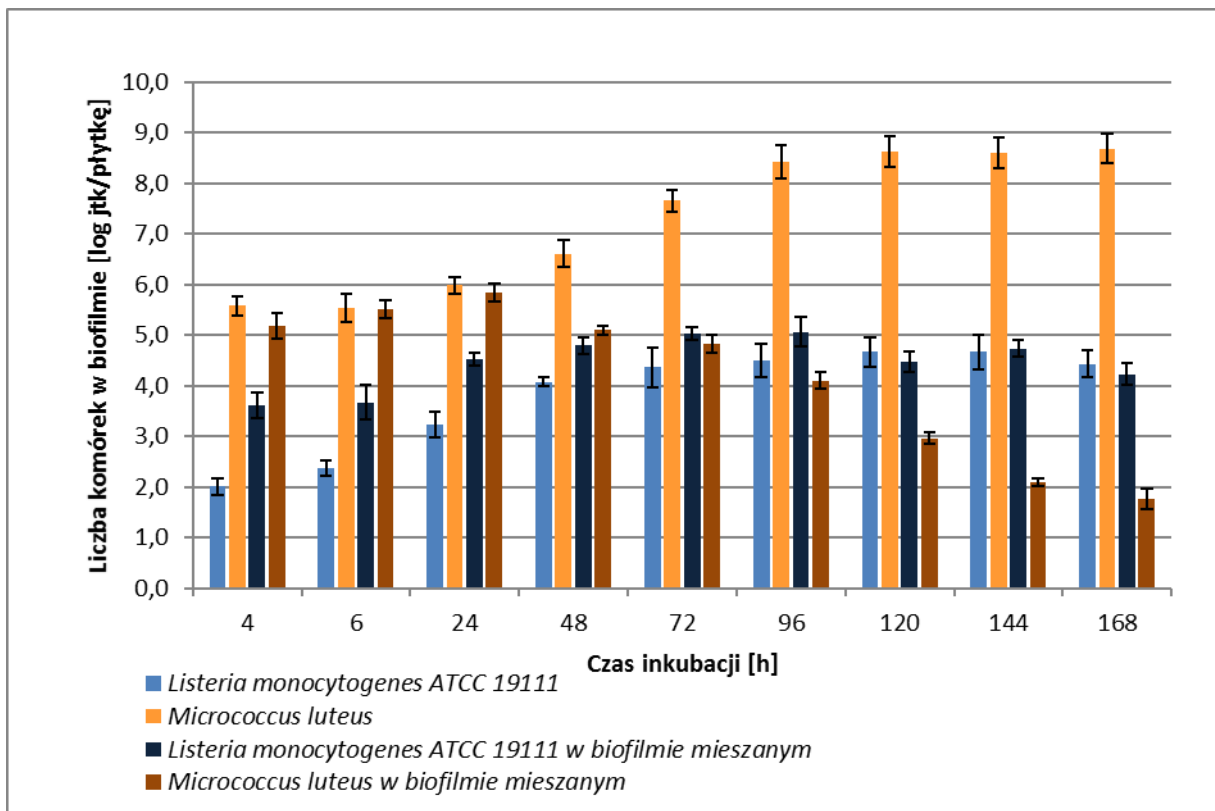
b – objętość zawiesiny wyjściowej

Wyniki badań poddawano analizie statystycznej w programach komputerowych: Excel, 2007 i Statistica 6,0 (PL), wykorzystując następujące parametry i testy: średnia (z trzech oznaczeń), odchylenie standardowe, test istotności różnic – analizę wariancji ANOVA.

WYNIKI I DYSKUSJA

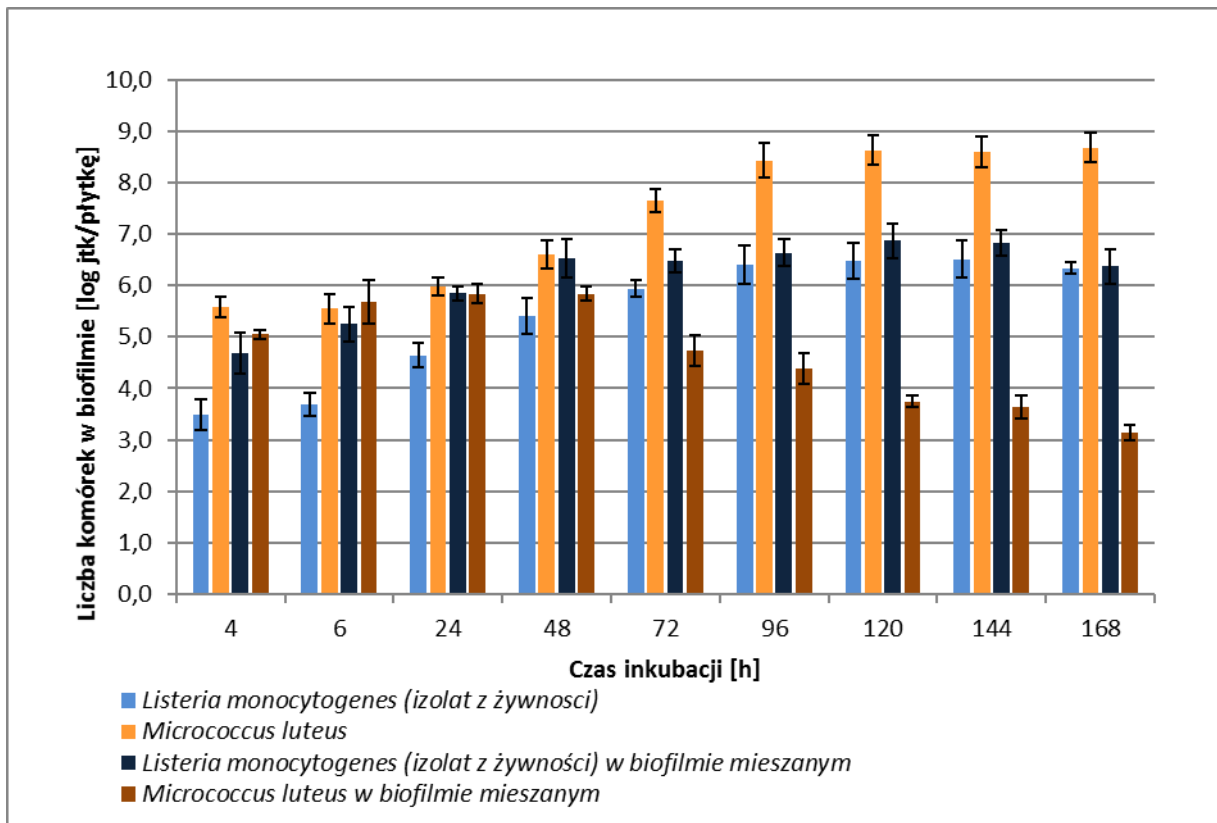
Formowanie biofilmu jest procesem złożonym, warunkowanym wieloma czynnikami takimi jak: wydzielanie przez drobnoustroje zewnątrzkomórkowych substancji, głównie polisacharydów i białek, hydrofobowość/hydrofilowość oraz ładunek powierzchni komórki, faza wzrostu komórki, rodzaj i charakter powierzchni stałej, czynniki środowiskowe. Poza wymienionymi faktorem istotną rolę odgrywa również obecność innych mikroorganizmów w środowisku wzrostu. Niektóre gatunki drobnoustrojów nie ulegają adhezji, jeśli są użyte w czystych kulturach, natomiast w hodowlach mieszanych kolonizują różne powierzchnie, co świadczy o tym, że włączają się w już istniejący biofilm. Obecność w środowisku populacji mieszanych może również przyspieszać proces adhezji oraz umożliwiać przyczepianie się komórek patogennych, które same nie posiadają takich uzdolnień [Czaczyk 2004]. Przeprowadzone badania wykazały, że komórki wzorcowego szczepu *Listeria monocytogenes* w obecności *Micrococcus luteus* ulegały adhezji do powierzchni polipropylenu efektywniej niż w czystej hodowli. Ich liczba była o około 1,5 log jtk/płytke wyższa podczas pierwszych

24 godzin inkubacji w porównaniu z monokulturowym biofilmem tego drobnoustroju. W czasie od 2 do 6 dnia inkubacji liczba *Listeria monocytogenes* w biofilmie mieszanym utrzymywała się na stałym poziomie 4,5–5,1 log jtk/płytkę, natomiast w 7 dniu doświadczenia odnotowano niewielki jej spadek do 4,2 log jtk/płytkę. Liczba wykrywanych bakterii *Micrococcus luteus* w czasie pierwszych 24 godzin doświadczenia kształtowała się na poziomie zbliżonym do tej, jaką odnotowano w biofilmie monokulturowym. W czasie kolejnych 6 dni hodowli obserwowano stopniowy spadek liczby komórek *Micrococcus luteus* w biofilmie do poziomu 1,8 log jtk/płytkę po 7 dniach inkubacji (wartość o 6,9 log jtk/płytkę niższa, w porównaniu z biofilmem monokulturowym) (rysunek 1).



Rysunek 1. Tworzenie biofilmu *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 i *Micrococcus luteus* na powierzchni polipropylenu
Biofilm formation of Listeria monocytogenes ATCC 19111 and Micrococcus luteus on polypropylene surface

Podobne zależności pomiędzy drobnoustrojami odnotowano w badaniach z użyciem drugiego szczepu *Listeria monocytogenes* (izolat z żywności), przy czym liczba wykrywanych komórek tej bakterii w biofilmie była wyższa w porównaniu ze szczepem wzorcowym i kształtowała się na poziomie od 4,7 log jtk/płytkę, po 4 godzinach do 6,4 log jtk/płytkę po 7 dniach inkubacji (rysunek 2).

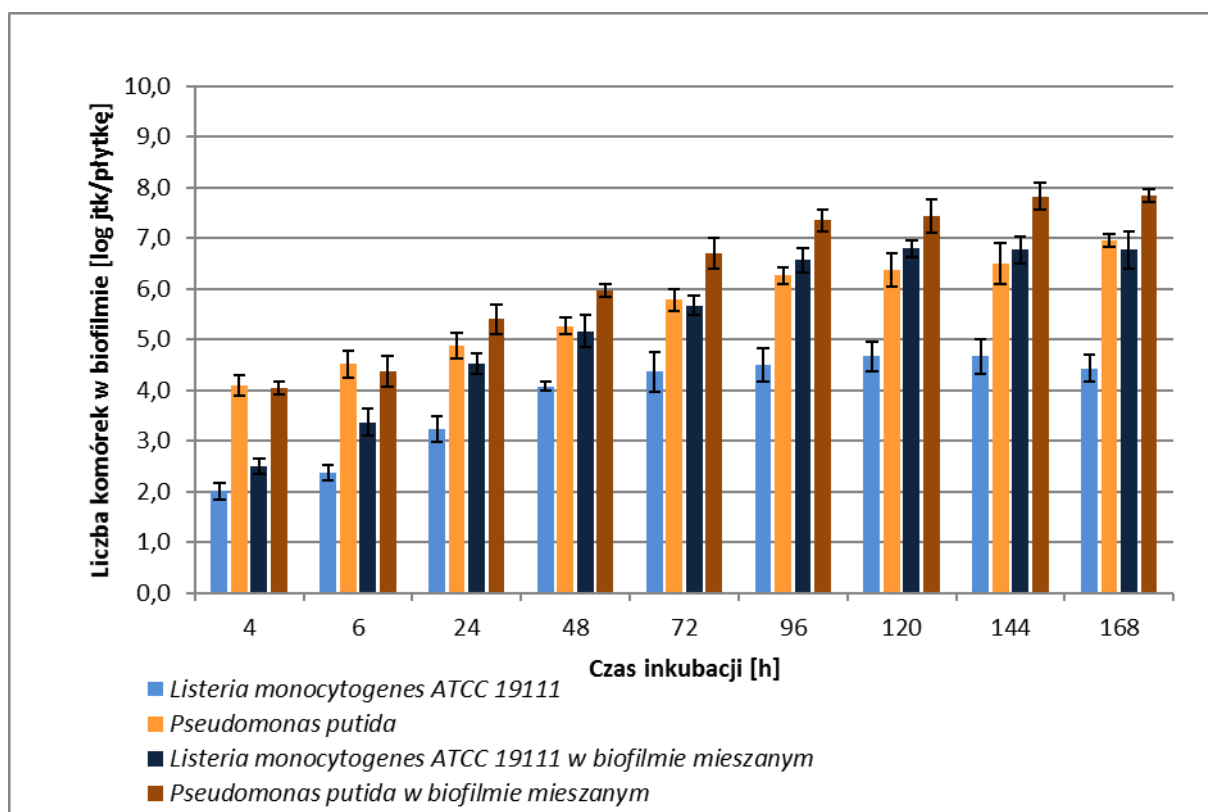


Rysunek 2. Tworzenie biofilmu *Listeria monocytogenes* (izolat z żywności) i *Micrococcus luteus* na powierzchni polipropylenu
Biofilm formation of Listeria monocytogenes (food isolate) and Micrococcus luteus on polypropylene surface

Uzyskane wyniki pokazują, że obecność w środowisku wzrostu *Micrococcus luteus* sprzyjała adhezji komórek *Listeria monocytogenes* w pierwszych godzinach hodowli i zwiększała ich udział w dojrzałym biofilmie. Ponadto *Listeria monocytogenes* po osiągnięciu określonej gęstości (10^5 – 10^6 jtk/płytkę) wykazywała działanie antagonistyczne wobec *Micrococcus luteus*, o czym świadczył wyraźny spadek liczby tego drugiego drobnoustroju. Prawdopodobnie w początkowych etapach adhezji komórki *Listeria monocytogenes*, korzystając z dużych zdolności bakterii *Micrococcus luteus* do tworzenia biofilmu, włączały się w tworzoną przez nie strukturę w ilości większej niż tworząc biofilm w czystej hodowli. Ponadto, komórki *Listeria monocytogenes* mogły być również chronione

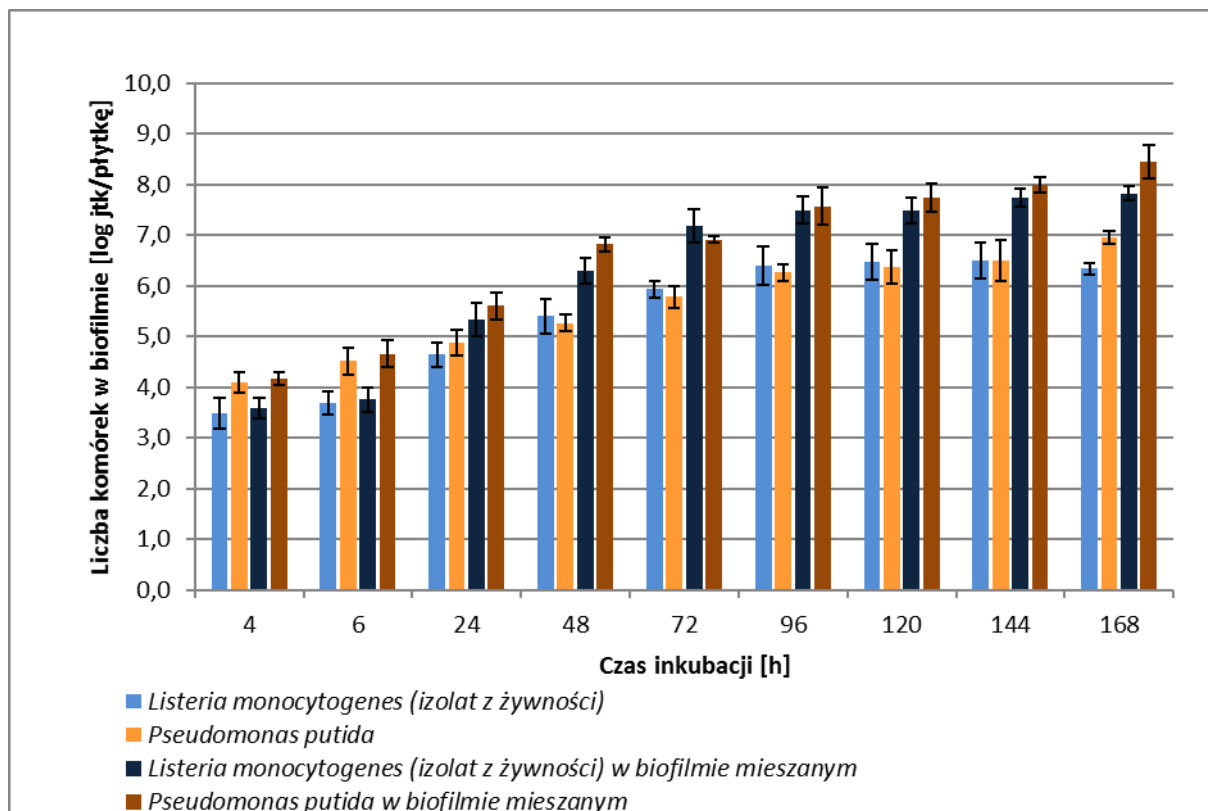
przez *Micrococcus luteus*, w związku z czym mniej z nich ulegało uszkodzeniom, uniemożliwiającym wzrost na podłożach w warunkach laboratoryjnych. Stąd też mogły wynikać różnice w uzyskiwanych wartościach liczby *Listeria monocytogenes* w biofilmie tworzonym w czystej i mieszanej hodowli. Należy bowiem wspomnieć, iż według niektórych autorów tylko około 1% drobnoustrojów tworzących biofilm jest zdolnych do wzrostu w warunkach laboratoryjnych, na rutynowo stosowanych w diagnostyce mikrobiologicznej podłożach hodowlanych, pozostałe zaś to tzw. bakterie VBNC (ang. *viable but non-culturable*) lub ABNC (ang. *active but non-culturable*) [Olszewska, Łaniewska-Trokenheim 2011; Trafny 2012a]. Spadek liczby komórek *Mirococcus luteus* odnotowany w dalszych etapach doświadczenia mógł być spowodowany antagonistycznym działaniem ze strony *Listeria monocytogenes*, poprzez indukcję zjawiska *quorum sensing*, czyli proces chemicznego komunikowania się komórek. Prawdopodobne jest, iż populacja *Listeria monocytogenes* po osiągnięciu gęstości 5,0–6,0 log jtk/płytkę uruchomiła mechanizm wytwarzania określonych związków chemicznych, eliminujących komórki *Micrococcus luteus* w celu zdominowania zasiedlanej niszy ekologicznej.

W doświadczeniach tworzenia biofilmu przez *Listeria monocytogenes* (szcep wzorcowy) w obecności bakterii *Pseudomonas putida* zaobserwowano, że liczba komórek obydwu drobnoustrojów w biofilmie mieszanym kształtowała się na poziomie znacznie wyższym w porównaniu z biofilmami monokulturowymi. W przypadku *Listeria monocytogenes* uzyskano wartości od 2,5 do 6,8 log jtk/płytkę, natomiast *Pseudomonas putida* od 4,0 do 7,8 log jtk/płytkę (rysunek 3). Otrzymane wyniki potwierdzają badania niektórych autorów, w których wykazano, że *Listeria monocytogenes* efektywniej tworzy biofilm w obecności tzw. wczesnych kolonizatorów, w tym przypadku *Pseudomonas putida* [Buchanan, Bagi 1999; Del Campo i in. 2001].



Rysunek 3. Tworzenie biofilmu *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 i *Pseudomonas putida*
Biofilm formation of Listeria monocytogenes ATCC 19111 and *Pseudomonas putida* on polypropylene surface

W biofilmie mieszanym tworzonym przez szczep *Listeria monocytogenes* (izolat z żywności) i *Pseudomonas putida* w czasie pierwszych 6 godzin hodowli nie stwierdzono różnic w liczbie wykrywanych komórek obydwu bakterii na powierzchni polipropylenu w porównaniu z biofilmami jednogatunkowymi. Od 24 godziny do 7 dnia inkubacji liczba komórek zarówno *Listeria monocytogenes*, jak i *Pseudomonas putida* w biofilmie mieszanym była wyższa, o średnio 1–1,5 log jtk/płytka, od wartości uzyskanych dla biofilmów jednogatunkowych (rysunek 4).



Rysunek 4. Tworzenie biofilmu przez *Listeria monocytogenes* (izolat z żywności) i *Pseudomonas putida* na powierzchni polipropylenu
Biofilm formation Listeria monocytogenes (food isolate) and Pseudomonas putida on polypropylene surface

Liczebność komórek obydwu gatunków drobnoustrojów w biofilmie mieszanym od 24 godziny hodowli była na znacznie wyższym poziomie niż w biofilmach jednogatunkowych, co przemawia za istnieniem synergistycznych oddziaływań pomiędzy badanymi bakteriami. Powyższe spostrzeżenie dotyczy zarówno szczepu wzorcowego *Listeria monocytogenes*, jak i wyizolowanego z żywności. Obecność bakterii *Pseudomonas putida*, dzięki dużym zdolnościom tworzenia biofilmu (prawdopodobnie na skutek intensywnego wytwarzania zewnątrzkomórkowych biopolimerów), zwiększała efektywność przyłączania się komórek *Listeria monocytogenes* do powierzchni polipropylenu w pierwszych godzinach eksperymentu. W dalszych etapach formowania biofilmu bakterie *Pseudomonas putida* mogły wykazywać protekcyjne działanie wobec komórek *Listeria monocytogenes*, pozostając jednocześnie niewrażliwe na metabolity wytwarzane przez *Listeria monocytogenes* lub wręcz wykorzystując je we własnych szlakach metabolicznych.

Przeprowadzone doświadczenia potwierdzają, iż w wielokulturowych biofilmach zachodzą różne oddziaływania powodujące dominację jednych oraz eliminację innych drobnoustrojów. Specyfika budowy i funkcjonowania biofilmu sprawia, że interakcje

zachodzące pomiędzy drobnoustrojami są często całkowicie odmienne od tych, jakie mają miejsce w hodowlach komórek planktonicznych. Istotne jest więc prowadzenie badań zmierzających do dokładnego poznania mechanizmów oddziaływań pomiędzy mikroorganizmami w biofilmie, w celu wykorzystania ich do opracowania skutecznych strategii zwalczania i zapobiegania tworzeniu się tych struktur.

WNIOSKI

1. Tworzenie biofilmów wielogatunkowych zachodzi szybciej i efektywniej niż biofilmów jednogatunkowych.
2. Liczebność poszczególnych drobnoustrojów w biofilmach mieszanych jest zmienna w czasie i zależy od zachodzących między nimi oddziaływań.
3. Drobnoustroje natywne środowiska produkcji żywności: *Micrococcus luteus* i *Pseudomonas putida* wykazywały protekcyjne działanie w stosunku do komórek *Listeria monocytogenes* w biofilmie.
4. Bakterie *Listeria monocytogenes* po osiągnięciu przez populację odpowiednio wysokiej gęstości w biofilmie wykazywały antagonistyczne działanie wobec *Micrococcus luteus*, co wskazuje na indukcję mechanizmu *quorum sensing*.
5. Badania mechanizmów oddziaływań międzygatunkowych zachodzących w biofilmach są elementem niezbędnym dla opracowania skutecznych strategii zwalczania i zapobiegania tworzenia się biofilmów.

PIŚMIENNICTWO

1. Amalaradjou M. A. R., Norris C. E., Venkitanarayanan K. (2009). Effect of octenidine hydrochloride on planctonic cells and biofilms of *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol., 75 (12), 4089-4092
2. Ayebah B., Hung Y., Frank J. F. (2005). Enhancing the bactericidal effect of electrolyzed water on *Listeria monocytogenes* biofilms formed on stainless steel. J. Food Prot., 68 (7), 1375-1380
3. Baker M. G., Lalonde S. V., Konhauser K. O., Foght J. M. (2010). Role of extracellular polymeric substances in the surface chemical reactivity of *Hymenobacter aerophilus*, a psychrotolerant bacterium. Appl. Environ. Microbiol., 76 (1), 102-109
4. Berthold A. (2007). Biofilm w przemyśle spożywczym. Post. Techn. Przetw. Spoż., 1, 60-66

5. Bremer P. J., Monk J., Osborne C. M. (2001). Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium* spp. *J. Food Prot.*, 64, 1369-1376
6. Buchanan R. L., Bagi L. K. (1999). Microbial competition: Effect of *Pseudomonas fluorescens* on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.*, 16, 523-529
7. Carpentier B., Chassaing D. (2004). Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *Int. J. Food. Microbiol.*, 97 (2), 111-122
8. Chmielewski R. A. N., Frank J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Com. Rev. F. Sc. F. Saf.*, 2, 22-32
9. Costerton J. W. (1999). The role of bacterial exopolysaccharides in nature and disease. *J. Int. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 551-563
10. Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., Lappin-Scott H. M. (1995). Microbial biofilms. *Ann. Rev. Microbiol.*, 41, 711-745
11. Czaczyk K. (2004). Czynniki warunkujące adhezję drobnoustrojów do powierzchni abiotycznych. *Post. Mikrobiol.*, 43, 267-283
12. Czaczyk K., Wojciechowska K. (2003). Tworzenie biofilmów bakteryjnych – istota zjawiska i mechanizmy oddziaływań. *Biotechnologia*, 3 (62), 180-192
13. Del Campo J., Carlin F., Nguyen-The C. (2001). Effects of epiphytic *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* on the growth of *Listeria monocytogenes* in model media. *J. Food Prot.*, 64 (5), 721-724
14. Dwardzińska W., Dworecka-Kaszak B. (2014). Biofilm bakteryjny płytki nazębnej i jego znaczenie w chorobach jamy ustnej psów i kotów. *Życie Wet.* 89 (3), 216-221
15. Karunakaran E., Mukherjee J., Ramalingam B., Biggs C. A. (2011). "Biofilmology": a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 90, 1869-1881
16. Kołwzan B. (2011). Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstawania i funkcjonowania. *Ochr. Środ.*, 33 (4), 1-14
17. Koo O-K., Eggleton M., O'Brian C. A., Crandall P. G., Ricke S. C. (2012). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* on frankfurters formulated with and without lactate/diacetate. *Meat Sci.*, 92, 533-537
18. Myszka K., Czaczyk K. (2007). Metody usuwania biofilmów bakteryjnych z powierzchni stałych. *Przem. Spoż.*, 2, 18-21

19. Nikolaev Y. A., Plakunov V. K. (2007). Biofilm – “city of microbes” or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology*, 76 (2), 125-138
20. Olszewska M., Łaniewska-Trokenheim Ł. (2011). Badanie stanu „niehodowalności” komórek bakterii fermentacji mlekowej w niesprzyjających warunkach rozwoju. *Med. Wet.*, 67 (2), 105-109
21. Pasich E., Walczewska M., Pasich A., Marcinkiewicz J. (2013) Mechanizm i czynniki ryzyka powstawania BIOFILMU BAKTERYJNEGO JAMY USTNEJ. *Pst. Hig. Med. Dośw.* 67 736-741
22. Ploux L., Beckendorff S., Nardin M., Neunlist S. (2007). Quantitative and morphological analysis of biofilm formation on self-assembled monolayers. *Colloids and Surfaces B.*, 57, 174-181
23. Todhanakasem T. (2013). Microbial biofilm in the industry. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 7 (17), 1625-1634
24. Trafny E. A. (2012a). Jak zdobyć i wykorzystać wiedzę o wielogatunkowych biofilmach. *Post. Mikrobiol.*, 51 (3), 205-211
25. Trafny E. A. (2012b). Wzajemne oddziaływania drobnoustrojów w biofilmach wielogatunkowych. *Forum Zakażeń*, 3 (1), 13-16
26. Van der Veen S., Abee T. (2011). Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and paracetic acid. *Int. J. Food Microbiol.*, 144, 421-431
27. Zottola E. A., Sasahara K. C. (1994). Microbial biofilms in the food processing industry – should they be a concern? *Int. J. Food Microbiol.*, 23, 125-148