

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy
w Warszawie

mgr inż. Justyna Nasiłowska

**Stan fizjologiczny wybranych patogenów w sokach
z warzyw korzeniowych po procesie utrwalania
wysokim ciśnieniem**

The physiological state of selected pathogens in root vegetable juices after high-
pressure processing

Praca doktorska
Doctoral thesis

Promotor:

Dr hab. inż., Barbara Sokołowska, prof. IBPRS-PIB
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego - PIB
Zakład Mikrobiologii

Promotor pomocniczy:

Dr inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska
Uniwersytet Warmińsko Mazurski
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności

Recenzenci:

Prof. dr hab. inż. Dorota Maria Kręgiel
Politechnika Łódzka
Katedra Biotechnologii Środowiskowej

Dr hab. inż. Edyta Malinowska-Pańczyk
Politechnika Gdańska
Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności

Warszawa, 2023

Serdeczne podziękowania składam

Pani dr hab. inż. Barbarze Sokołowskiej, Promotorowi niniejszej pracy za pomoc i rady podczas prowadzenia eksperymentów, przekazaną wiedzę, motywację do pracy, wyrozumiałość i cierpliwość.

Pani dr inż. Wioletcie Chajęckiej-Wierzchowskiej, Promotorowi pomocniczemu niniejszej pracy za cenne rady, krytyczne uwagi oraz okazaną sympatię.

Pani Paulinie Osuchowskiej za pomoc w analizie mikroskopowej.

Pani Danucie Kotyrbie za pomoc w analizie statystycznej.

Mojemu mężowi Piotrowi, trzem synom: Maksymilianowi, Bartłomiejowi i Bernardowi oraz całej rodzinie za każdy dzień zrozumienia, wsparcia, mobilizację do pracy i wiarę w to, że dzięki pracy mogę osiągnąć zamierzony cel.

Pracę dedykuję mojemu śp. Tacie i św. Józefowi

Oświadczenie promotora pracy

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia doktora.

Data.....

Podpis promotora pracy

Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że rozprawa doktorska przygotowana przeze mnie nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni lub innej uprawnionej instytucji naukowej.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data.....

Podpis autora pracy

STRESZCZENIE

Stan fizjologiczny wybranych patogenów w sokach z warzyw korzeniowych po procesie utrwalania wysokim ciśnieniem

Doniesienia literaturowe potwierdzają indukowanie niejednorodnej populacji drobnoustrojów po działaniu wysokiego ciśnienia (ang. high hydrostatic pressure - HHP), włączając populację uszkodzoną subletalnie. Komórki uszkodzone subletalnie charakteryzuje wydłużona faza zastoju, bardzo niski poziom aktywności metabolicznej i wrażliwość na składniki selektywne, co przekłada się na niedoszacowanie lub nawet niewykrycie żywych komórek w badanej próbce metodami klasycznymi. Stymulacja mechanizmów naprawczych w komórce i szybka umiejętność adaptacji do zmienionych warunków mogą przyczynić się do namnożenia mikroorganizmu w żywności szczególnie podczas niewłaściwego przechowywania.

Rozprawa doktorska poświęcona jest analizie stanu fizjologicznego komórek bakteryjnych *E. coli* oraz *L. innocua* poddanych działaniu HHP, ze szczególnym uwzględnieniem możliwości regeneracji komórek uszkodzonych subletalnie w sokach z warzyw korzeniowych podczas 4-tygodniowego okresu przechowywania w dwóch temperaturach (5°C oraz 25°C).

Przebadano w jaki sposób parametry procesu wpływają na rodzaj indukowanych uszkodzeń w komórkach bakterii. Zbadano także wpływ rodzaju matrycy, temperatury, rodzaju drobnoustroju i specyfiki wywołanych zmian w komórce na proces regeneracji komórek uszkodzonych subletalnie. Dodatkowo praca została wzbogacona o aktualny stan wiedzy dotyczący uszkodzeń subletalnych wywołanych przez wysokie ciśnienie.

Uzyskane wyniki wskazują jednoznacznie, że działanie HHP w zakresie 300-500 MPa generuje niejednorodną populację bakterii. Analiza mikroskopowa udowodniła, że HHP wywołuje zmiany w obszarze cytoplazmy i genomu bakteryjnego. Potwierdzono, że stopień inaktywacji badanych szczepów zwiększa się wraz ze wzrostem zadanego ciśnienia, natomiast nie w każdym przypadku wydłużenie czasu ekspozycji przy zachowaniu stałego ciśnienia skutkowało zmniejszeniem liczby żywych komórek w populacji. Wykonane badania nie wykazały jednoznacznej zależności pomiędzy parametrami procesu HHP oraz rodzajem matrycy, a poziomem wywołanych uszkodzeń subletalnych w komórkach badanych bakterii. Udowodniono, że charakter medium oraz pochodzenie szczepów wpływają na wrażliwość populacji względem metody HHP.

Ostatnią część badań stanowiły próby przechowalnicze z wyznaczeniem potencjału wzrostu (δ) testowych bakterii oraz współczynnika regeneracji (R_r). Wykazano, że sok z marchwi wspomagał wzrost komórek *L. innocua* w temperaturze 5°C. Obserwowano regenerację komórek uszkodzonych subletalnie w soku z marchwi dla większości badanych szczepów. Nie odnotowano regeneracji ani wzrostu liczby komórek w populacjach badanych szczepów zawieszonych w soku z buraków ćwikłowych w czasie przechowywania w obydwu temperaturach. Pomimo iż analizy mikrobiologiczne przeprowadzono zgodnie z obowiązującymi normami, w których zapewniona była regeneracja komórek uszkodzonych subletalnie, wzrost *E. coli* na selektywnej pożywce TBX był słabszy niż na płytkach dwuwarstwowych TAL. Uzyskane wyniki potwierdzają zasadność zastosowania płytek dwuwarstwowych TAL do oceny bezpieczeństwa mikrobiologicznego badanych soków z warzyw korzeniowych poddanych działaniu HHP. Dodatkowo praca została wzbogacona o aktualny stan wiedzy dotyczący uszkodzeń subletalnych wywołanych przez wysokie ciśnienie.

Podsumowując, w pracy udowodniono zdolność komórek uszkodzonych subletalnie w wyniku działania HHP do regeneracji w soku z warzyw korzeniowych o pH bliskim obojętnemu.

Słowa kluczowe: uszkodzenia subletalne, wysokie ciśnienie hydrostatyczne (HHP), soki z warzyw korzeniowych, badania przechowalnicze, potencjał wzrostu, mikroskopia epifluorescencyjna (EFM), skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM), transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

ABSTRACT

The physiological state of selected pathogens in root vegetable juices after high-pressure processing

Scientific research has confirmed that high hydrostatic pressure (HHP) treatment induces a heterogeneous population of microorganisms, including the sublethally injured population. Sublethally injured cells are characterized by an extended stagnation phase, a very low level of metabolic activity and sensitivity to selective components. The above-mentioned may underestimate its presence or even not detect the living cells in the sample when classical methods are used. Stimulation of repair mechanisms as well as the quick cell ability to adapt to modified conditions may result in the multiplication of the microorganism in food, especially during improper storage.

The doctoral dissertation is devoted to the analysis of the physiological state of HHP-treated *E. coli* and *L. innocua* bacterial cells, with particular emphasis on the possibility of regeneration of sublethally injured cells in root vegetable juices during a 4-week storage at two temperatures (5°C and 25°C).

It was examined how the process parameters affect the type of induced damage in bacterial cells. The influence of the type of matrix, temperature, type of microorganism and the specificity of the induced changes in the cell on the regeneration of sublethally damaged cells was also determined.

The obtained results clearly indicate that the HHP method in the range of 300-500 MPa generates a heterogeneous population of bacteria. Microscopic analysis proved that HHP causes changes in the cytoplasm and bacterial genome. It was confirmed that the level of inactivation of the tested strains increases with the pressure. However, with a constant pressure and the extension of the exposure time, there was no correlation to the inactivation levels observed. The obtained results did not prove a clear relationship between the HHP parameters, the type of matrix, and the level of sublethal damage in the cells of the tested bacteria. It has been proven that the medium character and the origin of the strains affect the HHP sensitivity of the population.

The last part of this research was related to the shelf-life tests. The growth potential (δ) and recovery ratio (R_r) were determined. The results of this study indicate that carrot juice supports the growth of *L. innocua* at 5°C. The regeneration of sublethally injured cells in carrot juice was observed for most of the tested strains. There was neither any regeneration nor bacterial increase in beetroot juice during storage at both temperatures. Although the microbiological analyses were carried out in accordance with the applicable ISO standards, which ensured the regeneration of sublethally damaged cells, the growth of *E. coli* was lower on the selective TBX medium than on the TAL plates. The obtained results confirmed the TAL validity to assess the microbiological safety of the tested HHP-treated root vegetable juices. Additionally, the paper presents the current state of knowledge regarding sublethal injuries caused by high pressure

In conclusion, the paper proved the abilities of HHP - sublethally injured cells to regenerate in low-acid root vegetable juice.

Key words: sublethal injury, high hydrostatic pressure (HHP), root vegetable juices, shelf-life studies, growth potential, epifluorescence microscopy (EFM), scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM)

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	7
WYKAZ SKRÓTÓW	11
WSTĘP	13
WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA	15
1. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA	17
1.1. Metoda wysokiego ciśnienia hydrostatycznego	17
1.2. Uszkodzenia i regeneracja komórek bakteryjnych.....	19
1.2.1. Odpowiedź komórkowa bakterii na zmiany środowiska	19
1.2.2. Uszkodzenia komórek bakteryjnych	21
1.2.3. Regeneracja komórek uszkodzonych subletalnie, a bezpieczeństwo mikrobiologiczne żywności.....	22
1.3. Metody hodowlane stosowane do oszacowania liczby i regeneracji komórek uszkodzonych subletalnie w populacji bakterii.....	23
1.4. Metody mikroskopowe do oceny stanu fizjologicznego komórek w populacji.....	26
2. HIPOTEZY I CEL PRACY	29
2.1. Cel główny i hipotezy badawcze.....	29
2.2. Etapy realizowanych badań, cele szczegółowe oraz zakres pracy	29
3. MATERIAŁ DOŚWIADCZALNY I METODY BADAŃ.....	33
3.1. Materiał biologiczny.....	33
3.2. Bufory i soki z warzyw korzeniowych.....	33
3.3. Aparatura badawcza	33
3.4. Metody badań	34
4. OSIĄGNIĘCIA BADAWCZE PRZEDSTAWIONE DO OCENY	41
4.1. Określenie wpływu parametrów procesu HHP oraz matrycy na przeżywalność i stopień wywołanych uszkodzeń subletalnych w komórkach bakterii <i>L. innocua</i> oraz <i>E. coli</i> (realizacja etapu I).....	41

4.1.1.	Wpływ parametrów procesu HHP na przeżywalność komórek bakteryjnych w roztworach modelowych i sokach z warzyw korzeniowych.....	41
4.1.2.	Wpływ parametrów procesu HHP na wywołanie uszkodzeń subletalnych komórek bakteryjnych	45
4.2.	Analiza mikroskopowa stanu fizjologicznego komórek bakteryjnych poddanych działaniu HHP (realizacja etapu II)	48
4.3.	Analiza przeżywalności i regeneracji komórek uszkodzonych subletalnie w sokach z warzyw korzeniowych poddanych działaniu HHP, podczas długoterminowego przechowywania (realizacja etapu III).....	51
4.3.1.	Próbki kontrolne (nie poddane działaniu HHP).....	52
4.3.2.	Próbki soku z marchwi poddane działaniu HHP	54
4.3.3.	Próbki soku z buraków ćwikłowych poddane działaniu HHP.....	55
4.3.4.	Odzysk komórek uszkodzonych subletalnie na pożywkach agarowych	55
5.	STWIERDZENIA I WNIOSKI.	57
6.	BIBLIOGRAFIA:	61
7.	ANEKS	67
	KOPIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ WRAZ Z OŚWIADCZENIAMI WSPÓŁAUTORÓW	67
	WYKAZ POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH.....	157

WYKAZ SKRÓTÓW

- ALOA** – pożywka agarowa do oznaczania bakterii z rodzaju *Listeria* wg Ottaviani i Agosti
- BHI** – bullion sercowo-mózgowy (ang. Brain Heart Infusion)
- BPW** – zbuforowana woda peptonowa, rozcieńczalnik do oznaczenia bakterii *L. innocua*
- EM** – mikroskopia elektronowa (ang. Electron Microscopy)
- EFM** – mikroskopia epifluorescencyjna (ang. Epifluorescence Microscopy)
- HHP** – wysokie ciśnienie hydrostatyczne (ang. High Hydrostatic Pressure)
- L/D** – procentowy stosunek komórek żywych i martwych (ang. Live/Dead)
- NA** – pożywka nieselektywna (ang. nonselective agar)
- PBS** – buforowany roztwór soli fizjologicznej (ang. Phosphate-Buffered Saline)
- PI** – jodek propidyny, fluorochrom (ang. propidium iodide)
- R_r** – współczynnik regeneracji (ang. recovery ratio)
- SA** – pożywka selektywna (ang. selective agar)
- SI** – uszkodzenia subletalne (ang. sublethal injury)
- SEM** – skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. Scanning Electron Microscopy)
- TAL** – płytka dwuwarstwowa (ang. Thin Agar Layer)
- TBX** – agar tryptonowo-żółciowo-glukuronidynowy do oznaczania bakterii *E. coli* (Tryptone Bile X-glucuronide agar)
- TEM** – transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. Transmission Electron Microscopy)
- TSA** – agar tryptonowo-sojowy (ang. Tryptic Soy Agar)
- TSYEA** – agar tryptonowo-sojowy z ekstraktem drożdżowym (ang. Tryptic Soy Yeast Extract Agar)
- δ** – potencjał wzrostu (ang. growth potential)

Polska zajmuje znaczące miejsce w produkcji rolniczej i eksporcie warzyw korzeniowych w Unii Europejskiej [GUS 2020], zaś produkcja soków stanowi ważną gałąź przemysłu rolno-spożywczego w naszym kraju. Ma to swoje odzwierciedlenie w bogatej ofercie niepasteryzowanych soków na polskim rynku. Wśród nich wyróżniane są produkty na bazie marchwi oraz buraków ćwikłowych. Stanowią one bogate źródło substancji bioaktywnych, które wspomagają walkę z wieloma chorobami cywilizacyjnymi takimi jak otyłość, cukrzyca, choroby serca czy choroby nowotworowe. Ponadto spożywanie ich zapobiega niedoborom wielu mikroelementów w organizmie. Do grupy tych prozdrowotnych związków zaliczane są niektóre witaminy (np. A oraz E), związki polifenolowe (np. flawonoidy, kwasy fenolowe oraz antocyjany), mikroelementy (np. selen) [Borowska 2003]. Niemniej jednak świeże soki warzywne mają ograniczony potencjał rynkowy ze względu na krótki okres trwałości, który nie przekracza 72 h. Badania naukowe prowadzone w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie potwierdziły, że soki z warzyw korzeniowych tj. sok z marchwi, marchwi i selera oraz z buraków z dodatkiem jabłek, są zanieczyszczone drobnoustrojami na poziomie sięgającym 10^5 – 10^7 jtk/ml [Sokołowska i wsp., 2011]. W praktyce przemysłowej do utrwalania soków stosuje się najczęściej metody oparte o procesy wysokotemperaturowe. Procesy termiczne powodują utratę dużej części związków niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu tj. witaminy, substancje bioaktywne, ze względu na ich właściwości termolabilne. Przemysł wychodząc naprzeciw współczesnym wymaganiom i potrzebom konsumentów dotyczącym „świeżości i naturalności” produktów poszukuje nowych, łagodnych i atermicznych technologii, które wydłużają okres przydatności produktu do spożycia bez zmiany jego właściwości sensorycznych, odżywczych oraz walorów zdrowotnych. Pojawienie się technologii wysokich ciśnień hydrostatycznych (High Hydrostatic Pressure - HHP) stało się jedną z możliwych dróg niskotemperaturowego przetwarzania produktów spożywczych, zapewniając przy tym ich bezpieczeństwo mikrobiologiczne. Technologia HHP dopiero w ostatnich latach spotkała się z zainteresowaniem polskich producentów, choć na świecie powszechnie stosowana jest w wielu krajach. Pomimo iż HHP zostało tak zaprojektowane, aby eliminować drobnoustroje niepożądane, udowodniono, że podczas obróbki generowana jest niejednorodna populacja, która obejmuje także komórki

uszkodzone subletalnie, stanowiące potencjalne zagrożenie dla konsumenta. W niniejszej pracy podjęto wysiłki badawcze, w celu wyjaśnienia wpływu wysokiego ciśnienia na wywołanie uszkodzeń w komórkach bakterii *Listeria innocua* oraz *Escherichia coli*, jako organizmów modelowych w odniesieniu do patogenów występujących w sokach z warzyw korzeniowych. Szczególny nacisk w prowadzonych badaniach położono na ocenę możliwości regeneracji komórek uszkodzonych subletalnie w czasie długoterminowego przechowywania produktu.

WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA

Na cykl publikacji stanowiących rozprawę doktorską pt.: „Stan fizjologiczny wybranych patogenów w sokach z warzyw korzeniowych po procesie utrwalania wysokim ciśnieniem” składa się spójny tematycznie zbiór 5 publikacji zgodny z wymaganiami art. 13 ust. 2 ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 Nr 65 poz. 595 ze zm.):

Cykl publikacyjny obejmuje cztery pozycje opublikowane w anglojęzycznych czasopismach należących do listy Journal Citation Report oraz jednej pozycji w czasopiśmie krajowym.

[P1] **Nasiłowska J.***, Sokołowska B., Fonberg-Broczek M. The impact of high hydrostatic pressure on inactivation and sublethal injury of foodborne pathogens in beetroot juice. *Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego*. 2016, vol. 71, no. 1, pp. 21–27 (6 pkt. MNiSW)

Mój wkład w powstanie publikacji wynosił 85%. Mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji i planu pracy, wyborze metodyki badań, wykonaniu doświadczeń, analizie i opracowaniu wyników, przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego.

[P2] **Nasiłowska J.***, Sokołowska B., Fonberg-Broczek M. Long-term storage of vegetable juices treated by high hydrostatic pressure: Assurance of the microbial safety. *BioMed Research International* 2018, 2, doi.org/10.1155/2018/7389381, (25 pkt. MNiSW, IF 2018=2,12)

Mój wkład w powstanie publikacji wynosił 85%. Mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji i planu pracy, wyborze metodyki badań, wykonaniu doświadczeń, analizie i opracowaniu wyników, przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego.

[P3] **Nasiłowska J.***, Sokołowska B., Fonberg-Broczek M. Behavior of *Listeria innocua* strains under pressure treatment – in-activation and sublethal injury. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 2019, 69(1), 45–52, doi: 10.31883/pjfns-2019-0004, (100 pkt. MNiSW, IF 2019=2,35)

Mój wkład w powstanie publikacji wynosił 85%. Mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji i planu pracy, wyborze metodyki badań, wykonaniu doświadczeń, analizie i opracowaniu wyników, przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego.

[P4] **Nasiłowska J.*** Kocot A., Osuchowska P. N.; Sokołowska B. High-pressure-induced sublethal injuries of food pathogens—microscopic assessment. *Foods* 2021, 10(12), 2940 doi:10.3390/foods10122940, (100 pkt. MEiN, IF 2021=4,35)

Mój wkład w powstanie publikacji wynosił 80%. Mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji i planu pracy, wyborze metodyki badań, wykonaniu części doświadczeń, analizie i opracowaniu wyników, przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego.

[P5] **Nasiłowska J.***, Sokołowska B., Fonberg-Broczek M. *Escherichia coli* and *Listeria innocua* stability in carrot juice preserved by high hydrostatic pressure. *AIMS Agriculture and Food* 2022, 7(3), 623-636, doi: 10.3934/agrfood.20220039 (40 pkt. MEiN, IF 2022=1,67)

Mój wkład w powstanie publikacji wynosił 85%. Mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji i planu pracy, wyborze metodyki badań, wykonaniu doświadczeń, analizie i opracowaniu wyników, przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego.

Spójny tematycznie zbiór publikacji będący podstawą do ubiegania się o tytuł doktora w dziedzinie nauk przyrodniczych, w dyscyplinie rolnictwo zawiera 5 publikacji o łącznym współczynniku IF = **10,49** zgodnie z rokiem publikacji, co odpowiada **271 punktom** MNiSW/MEiN.

Wszystkie prace zostały wykonane w ramach projektów badawczych finansowanych ze środków na działalność statutową IBPRS-PIB.

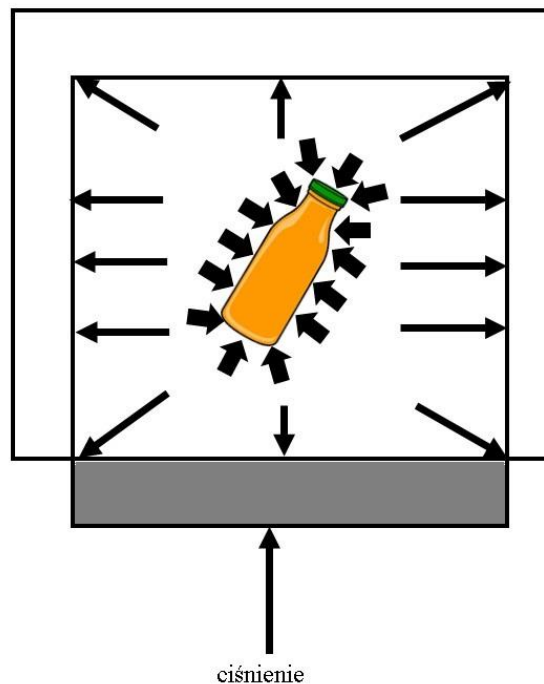
Oświadczenia współautorów o ich udziale w realizacji materiału naukowego przedstawionego w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską załączono do kopii publikacji przedkładanych do oceny.

* - jako autor korespondencyjny

1. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA

1.1. Metoda wysokiego ciśnienia hydrostatycznego

Obróbka wysokociśnieniowa (ang. High Pressure Processing/Pasteurization – HPP, High Hydrostatic Pressure – HHP, Ultra High Pressure – UHP, zwana też paskalizacją) należy do kategorii alternatywnych metod utrwalania żywności oraz napojów. Na skalę przemysłową została wdrożona po raz pierwszy w 1992 roku w Japonii. Wówczas wyprodukowano i wprowadzono na rynek dżemy oraz soki owocowe utrwalone wysokim ciśnieniem. W okresie kilkudziesięciu lat znalazła zastosowanie w przemyśle spożywczym do utrwalania produktów owocowo-warzywnych, mleczarskich, mięsnych, ryb i owoców morza. Ostatnie trendy pokazują, że stosowana jest także do utrwalania produktów gotowych do spożycia tzw. RTE, do żywności przeznaczonej dla niemowląt oraz karmy dla zwierząt domowych. Obecnie cieszy się także dużym zainteresowaniem w branżach farmaceutycznej i kosmetycznej. Metoda HHP niesie za sobą szereg korzyści w zakresie jakości i bezpieczeństwa żywności, spełniając przy tym wymagania organów ds. żywności. W ostatnich latach HHP stała się najlepiej skomercjalizowaną metodą nietermiczną o czym świadczy wzrastająca liczba urządzeń do przemysłowej obróbki wysokociśnieniowej [Suarez – Jacobo i wsp., 2011, Wang i wsp., 2016, Farkas 2016, Huang i wsp., 2017]. HHP jest procesem fizycznym polegającym na zastosowaniu wysokiego ciśnienia izostatycznego (do 600 MPa) przekazywanego przez ciecz (najczęściej wodę lub mieszaninę wody i glikolu propylenowego). Ciśnienie w komorze przekazywane jest do utrwalanego produktu natychmiastowo i równomiernie, niezależnie od jego wielkości i geometrii. Innymi słowy żywność jest ściskana przez równomierne ciśnienie z każdego kierunku (kompresja), a następnie powraca do swojego pierwotnego kształtu po zwolnieniu nacisku (dekompresja) (rysunek 1).



Rysunek 1. Zasada działania wysokiego ciśnienia izostatycznego (źródło: opracowanie własne).

Temperatura procesu przemysłowego mieści się w przedziale od 5°C do 20°C, zaś stosowany czas trwania to maksymalnie 10 minut. Wpływ temperatury na utrwalany produkt jest nieznaczny. Na dzień dzisiejszy wiadomo, że przy działaniu wysokiego ciśnienia zmiany w produkcie zachodzą głównie na skutek zmniejszenia się odległości między cząsteczkami i zachodzących między nimi interakcjami [Hać-Szymańczuk i Mroczek, 2006; Malinowska-Pańczyk i Kołodziejaska, 2010]. Ciśnienie działa destrukcyjnie na duże cząsteczki tj. polimery białkowe. W efekcie następuje znacząca redukcja enzymów, a wymiernym efektem tego zjawiska jest zahamowanie procesów enzymatycznego rozkładu w produkcie. Wysokie ciśnienie w minimalnym stopniu redukuje poziom tzw. substancji pożądaných tj. aminokwasy, witaminy, barwniki. Zatem utrwalony produkt cechuje się wysoką zawartością związków biologicznie aktywnych i zachowuje pierwotne właściwości sensoryczne [Torress Bello i wsp., 2014; Balakrishna i wsp., 2020]. Produkty utrwalane metodą HHP zachowują standardy tzw. „czystej etykiety”, gdyż zminimalizowane jest w nich stosowanie konserwantów i dodatków. Obróbka wysokociśnieniowa powoduje znaczną redukcję drobnoustrojów wegetatywnych, włączając gatunki psujące i patogenne. Efekt antymikrobiologiczny opiera się najprawdopodobniej na dwóch mechanizmach: mechanicznym niszczeniu osłon komórkowych oraz poprzez uszkodzenie materiału genetycznego. W piśmiennictwie można znaleźć liczne prace dotyczące niszczącego oddziaływania HHP na błonę komórkową drobnoustrojów oraz

wywołanych zmian wewnątrzkomórkowych [Malinowska-Pańczyk i Kołodziejska, 2007, Prieto-Calvo i wsp., 2014; Hsu i wsp., 2014; Huang i wsp., 2015]. Naukowcy niezmiennie od lat sugerują, że utrata integralności błony cytoplazmatycznej jest jednym z krytycznych zdarzeń prowadzących do śmierci komórki w wyniku działania wysokiego ciśnienia. W konsekwencji dochodzi do zwiększenia jej przepuszczalności, zakłócenia wymiany jonowej, a nawet deformacji struktury błony komórkowej. Ponadto ciśnienie może wpływać na organizację przestrzenną komórki powodując uszkodzenia mechanizmu genetycznego, zmiany w konformacji rybosomów oraz powstanie niekorzystnych reakcji biochemicznych [Hoover i wsp., 1989; Wouters i wsp. 1998; Pagan i wsp. 2000; Maldonado i wsp., 2016]. Według doniesień literaturowych najbardziej wrażliwe na działanie wysokiego ciśnienia są komórki bakterii Gram-ujemnych, następnie drożdży i pleśni, bakterii Gram-dodatnich, zaś najbardziej odporne są formy przetrwalnikujące [Huang i wsp., 2015]. W wyniku inaktywacji drobnoustrojów psujących wydłużony zostaje okres przydatności do spożycia, który w zależności od typu produktu waha się od 3 do 30 miesięcy. Redukcja patogenów metodą wysokiego ciśnienia może osiągnąć nawet 8 log (jtk/ml; jtk/g) spełniając wymagania Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) [EFSA, 2022]. Pomimo wyżej przytoczonych korzyści, obróbka wysokociśnieniowa ma swoje ograniczenia. Nie stosuje się jej do utrwalania produktów suchych (w których aktywność wody jest niższa niż 0,8). W przypadku niektórych produktów tj. mięso, jaja, ryby oraz całe owoce i warzywa powoduje zmiany ich tekstury, koloru i zapachu. Samo wysokie ciśnienie nie jest wystarczające do inaktywacji bakterii w formie przetrwalników. W tym przypadku należy zastosować system metod skojarzonych tzw. metodę płótków, polegającą na działaniu w ciągu (jeden po drugim) wielu czynników. Najczęściej jednym z elementów wchodzących w ciąg płótków jest wysoka temperatura, aktywująca kiełkowanie spor. Zadaniem metod utrwalania jest eliminacja drobnoustrojów niepożądanych. Natomiast kwestie dotyczące bezpiecznego stosowania HHP, w tym potencjalnych zagrożeń takich jak indukcja uszkodzeń subletalnych w komórkach, nadal są opiniowane przez EFSA [EFSA, 2022].

1.2. Uszkodzenia i regeneracja komórek bakteryjnych

1.2.1. Odpowiedź komórkowa bakterii na zmiany środowiska

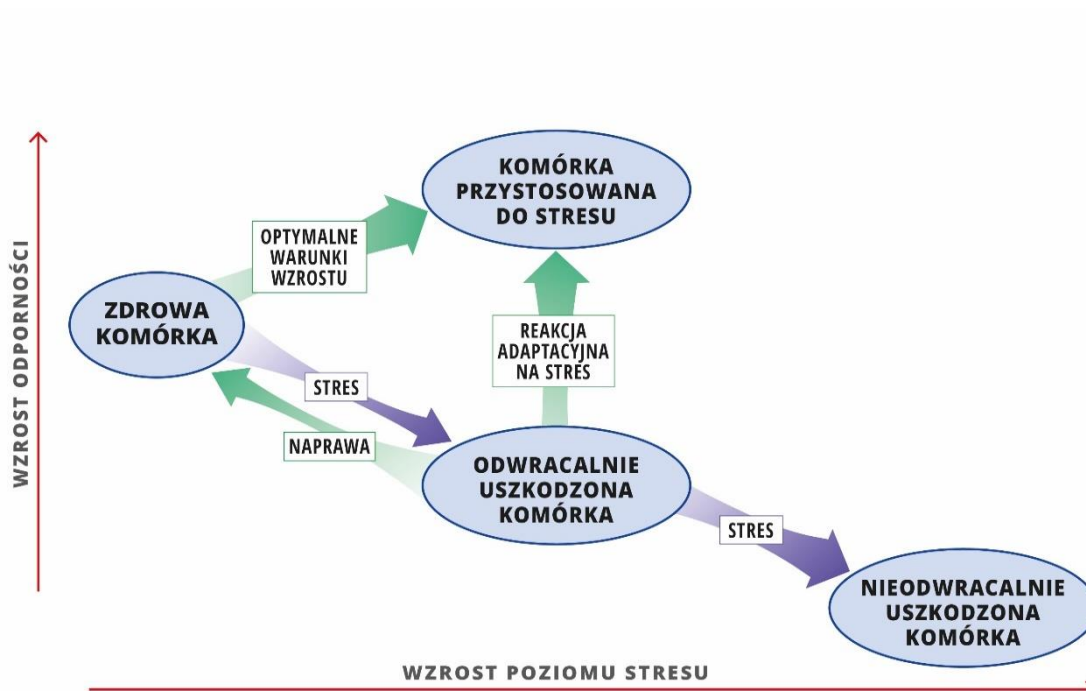
Bakterie są najprostszymi organizmami prokariotycznymi stanowiącymi jednokomórkowy twór. Każda komórka bakteryjna otoczona jest błoną cytoplazmatyczną, dodatkowo chronioną przez ścianę komórkową. Błona cytoplazmatyczna otacza materiał genetyczny zawierający wszystkie niezbędne informacje do odtworzenia komórki. Ściana

komórkowa stanowi granicę kontaktu wnętrza komórki ze środowiskiem i jest odpowiedzialna za utrzymanie kształtu oraz turgoru, niezbędnego do prowadzenia przemian metabolicznych, podziału komórkowego i wzrostu. Pełni także ważne funkcje przy transporcie jonów i innych cząsteczek [Baj i Markiewicz, 2015].

Wszystkie organizmy żywe, a więc każda pojedyncza komórka, posiada swoje optimum warunków wewnętrznych i zewnętrznych wpływających na jej prawidłowy oraz ukierunkowany rozwój. Obecność bądź brak różnych czynników fizycznych lub chemicznych, niekorzystnie wpływających na wzrost lub przeżywalność mikroorganizmów definiowany jest jako stres [Wesche i wsp., 2009]. Często nawet niewielkie zmiany w otoczeniu komórki stają się czynnikami stresowymi i powodują zaburzenie prawidłowego metabolizmu oraz spadek żywotności komórki. Zgodnie z powyższą definicją wiele zabiegów związanych z przetwarzaniem żywności uważa się za stesy, należące do kategorii stresów celowych [Evrendilek, 2012]. Powodują one zmiany w komórce o charakterze trwałym lub przejściowym. Zmiany te mogą być pozytywne np. przyczynić się do aktywacji mechanizmów obronnych tj. formowanie endospor przez bakterie Gram-dodatnie [Sztucki 2019] lub negatywne np. wywołać uszkodzenia w strukturze komórki. Nie wszystkie komórki w populacji mają identyczną odporność na czynnik stresowy. W konsekwencji generowana jest niejednorodna populacja obejmująca komórki o zróżnicowanym stanie fizjologicznym [Somolinos i wsp. 2008, Espina i wsp. 2016, Siderakou i wsp. 2021]. Fakt, iż ciśnienie oddziałuje na różne komponenty komórkowe, może wyjaśnić to zjawisko. Jednakże w zależności od komponentu, na które to ciśnienie zadziało, efekt tego działania może być różny, począwszy od niewielkiego naprawialnego uszkodzenia po efekt letalny [Hochman 1997]. Dlatego podczas badania kinetyki inaktywacji drobnoustrojów, zasadne jest uwzględnienie subpopulacji wrażliwej i odpornej na HHP. Badania takie prowadzone są w celu modelowania łącznego wpływu ciśnienia i czasu ekspozycji na generowanie uszkodzeń w populacji [EFSA, 2022]. Istnieje kilka modeli badania kinetyki inaktywacji drobnoustrojów w procesach nietermicznych. Nie wszystkie jednak zakładają, że populacja drobnoustrojów składa się de facto z kilku subpopulacji, a każda z nich ma własną kinetykę inaktywacji. Aby precyzyjnie ocenić skuteczność antydrobnoustrojową danej metody nietermicznej, należy wziąć po uwagę nie tylko poziom redukcji mikroorganizmów, ale także jej potencjał do wywoływania uszkodzeń subletalnych.

1.2.2. Uszkodzenia komórek bakteryjnych

W literaturze termin „uszkodzenie” został zdefiniowany wiele lat temu jako efekt narażenia komórki na czynniki szkodliwe [Hurst 1977]. Poziom uszkodzeń w przypadku każdej komórki jest indywidualny. Konsekwencją uszkodzeń są: zaburzenia funkcji życiowych, zmiany struktury błon komórkowych, zniszczenie wewnętrznych komponentów komórkowych, ekspresja niektórych genów powodująca zaburzenia czynnościowe. Rodzaj wywołanego uszkodzenia zależy nie tylko od rodzaju i/lub gatunku drobnoustroju oraz jego fazy wzrostu, środowiska w jakim się ono znajduje, ale także od siły działania danego czynnika stresowego [Hurst 1977]. Zależność pomiędzy wzrostem poziomu stresu, a wzrostem oporności komórki na ten czynnik obrazuje rysunek 2.



Rysunek 2. Wpływ warunków środowiskowych na zmiany zachodzące w komórce bakteryjnej (źródło: opracowanie własne na podstawie Wu i wsp. 2020)

Uszkodzenia komórek i ich struktur wywołane przez czynniki zewnętrzne można podzielić się na trzy grupy [Yamamoto i wsp., 2021]. Uszkodzenia letalne, które są nieodwracalne i niemożliwe do naprawy, bezwzględnie prowadzą do śmierci komórki. Uszkodzenia subletalne, czyli częściowe, których naprawa zależy od warunków w jakich znajduje się komórka bezpośrednio po działaniu niekorzystnego czynnika zewnętrznego.

Komórka uszkodzona subletalnie przechodzi w fazę stagnacji wzrostu, pozostając nadal żywa. Po regeneracji i adaptacji komórki do nowych warunków staje się aktywna metabolicznie. Uszkodzenia subletalne mogą się przekształcić w letalne, jeżeli np. komórki zostaną poddane działaniu czynnika szkodliwego po raz kolejny w krótkim czasie. Powyższe zjawisko ma miejsce m.in. podczas stosowania systemu metod skojarzonych. Trzecim wariantem jest powstanie uszkodzeń potencjalnie letalnych, czyli takich, które prowadzą do śmierci tylko wtedy, kiedy nie zostanie zatrzymana proliferacja. Wówczas komórka nie ma czasu na dokończenie naprawy, adaptacja nie nastąpi czego efektem będzie trwałe uszkodzenie komórki, czyli jej śmierci [Wesche i wsp., 2009, Huang i wsp., 2014, Wu i wsp., 2020, Yamamoto i wsp., 2021].

1.2.3. Regeneracja komórek uszkodzonych subletalnie, a bezpieczeństwo mikrobiologiczne żywności

Reakcja drobnoustrojów na stres stanowi potencjalne zagrożenie w przemyśle spożywczym [Espina i wsp. 2016]. Wiadomo, że stres związany z metodami konserwacji żywności wywołuje reakcje adaptacyjne w komórce bakteryjnej uszkodzonej subletalnie, a poniesione wówczas szkody w komórce stymulują jej naprawę [Wesche i wsp., 2009]. Jak wcześniej wspomniano regeneracja zależy od warunków w jakich znajduje się komórka. Matryce żywnościowe ze względu na różną charakterystykę mogą być zarówno bakteriostatyczne jak i bakteriobójcze. Czynniki wewnętrzne (np. pH i a_w), zewnętrzne (np. temperatura i atmosfera gazowa) i ukryte (np. interakcje z konkurencyjną mikroflorą tła) żywności określają, które mikroorganizmy chorobotwórcze i powodujące psucie się mogą rozwijać się w żywności podczas przechowywania aż do momentu spożycia. Szczególną uwagę należy zwrócić na produkty o niskiej kwasowości, sprzyjające rozwojowi drobnoustrojów. Dlatego przy doborze parametrów procesu należy wziąć pod uwagę nie tylko mikroflorę rodzimą, ale także właściwości konserwowanej żywności. Obecność subletalnie uszkodzonych mikroorganizmów w żywności jest istotnym aspektem, szczególnie w przypadku produktów konserwowanych technologiami nietermicznymi [Wesche i wsp., 2009]. z powyższego faktu wynika ryzyko, że podczas przechowywania żywności komórki takie mogą odzyskać zdolność do wzrostu. Stanowią potencjalne źródło jej zepsucia, a nawet poważne zagrożenia dla zdrowia publicznego.

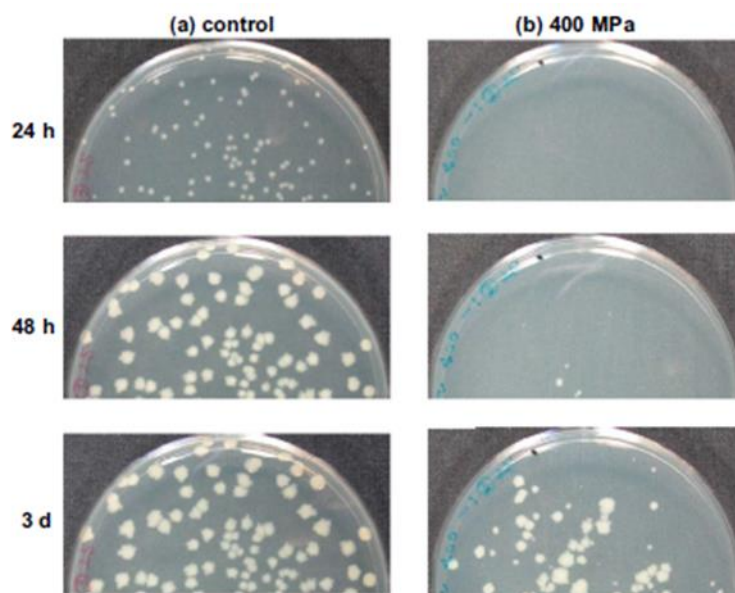
Regeneracja komórki jest procesem niezbędnym do wykrycia uszkodzonych bakterii zarówno metodami tradycyjnymi, jak i molekularnymi [Wu, 2008]. Identyfikacja zagrożeń dla produktu spożywczego powinna uwzględniać mikroorganizmy chorobotwórcze zdolne do

wzrostu w określonych i kontrolowanych warunkach uwzględniając opis produktu, technologię produkcji i sposób przechowywania. Zgodnie z rozporządzeniem Komisji Europejskiej nr 2073/2005, obowiązkiem każdego producenta jest objęcie gwarancją bezpieczeństwa wyrobu spożywczego do końca deklarowanego terminu przydatności. Ze względu na możliwość pojawienia się okoliczności, które negatywnie wpłyną na produkt w trakcie transportu, dystrybucji i przechowywania żywności, producent zobowiązany jest do wykonania badań przechowalniczych tzw. shelf life z uwzględnieniem testów obciążeniowych tzw. challenge tests. Testy obciążeniowe to praktyczne badania oceniające zachowanie kluczowych organizmów (np. patogenów) w danym produkcie. Wyznaczenie potencjału wzrostu tzw. growth potential (δ), dostarcza informacji czy w danym produkcie możliwy jest wzrost określonego drobnoustroju w czasie jego okresu przydatności do spożycia, a jeśli tak to jak szybko dany drobnoustrój może się namnażać. Powyższe analizy wykluczają lub potwierdzają, czy zastosowana technologia gwarantuje stabilność mikrobiologiczną utrwalanego produktu, a także pośrednio wykażą czy komórki uszkodzone subletalnie będą miały możliwość regeneracji [Serraino i Giacometti, 2014; Food Safety Authority of Ireland, 2017].

1.3. Metody hodowlane stosowane do oszacowania liczby i regeneracji komórek uszkodzonych subletalnie w populacji bakterii

Właściwa ocena skuteczności procesu utrwalania produktów spożywczych wiąże się z zapewnieniem jakości i bezpieczeństwa żywności. Ocenę inaktywacji określonego drobnoustroju lub grupy drobnoustrojów przeprowadza się stosując metody analityczne np. z wykorzystaniem klasycznych metod posiewu na pożywki selektywne, określone w znormalizowanych metodach referencyjnych. W efekcie uzyskuje się wynik jakościowy wykryto/nie wykryto lub wynik ilościowy mówiący w jakim stopniu liczba drobnoustrojów w populacji została zredukowana i czy spełnia kryteria bezpieczeństwa mikrobiologicznego. Subletalnie uszkodzone komórki cechują się wydłużoną fazą zastoju (lag-fazy) i bardzo niskim poziomem aktywności metabolicznej. Kimura i wsp. (2017) udowodnili, że komórki *E. coli* poddane działaniu HHP (400 MPa, 10 min.) charakteryzowały się wydłużonym czasem hodowli potrzebnym do wzrostu na nieselektywnej pożywce agarowej w porównaniu do populacji nietraktowanej wysokim ciśnieniem. Dodatkowo kolonie traktowane wysokim ciśnieniem wykazywały większą heterogeniczność pod kątem wielkości niż kolonie z próby kontrolnej (rysunek 3.). Komórki uszkodzone subletalnie wykazują ograniczony lub zahamowany wzrost na pożywkach selektywnych [Wesche i wsp. 2009], ponieważ uszkodzenie błony komórkowej skutkuje utratą funkcji osmoregulacyjnych [Mackey

i wsp., 1994]. Oznacza to, że komórki będąc nadal żywe mogą być niewykrywalne za pomocą klasycznych metod detekcji. z punktu widzenia prawidłowej interpretacji uzyskanych wyników, ważne jest zatem wykrycie wszystkich żywych komórek w populacji, zarówno nieuszkodzonych jak i subletalnie uszkodzonych.



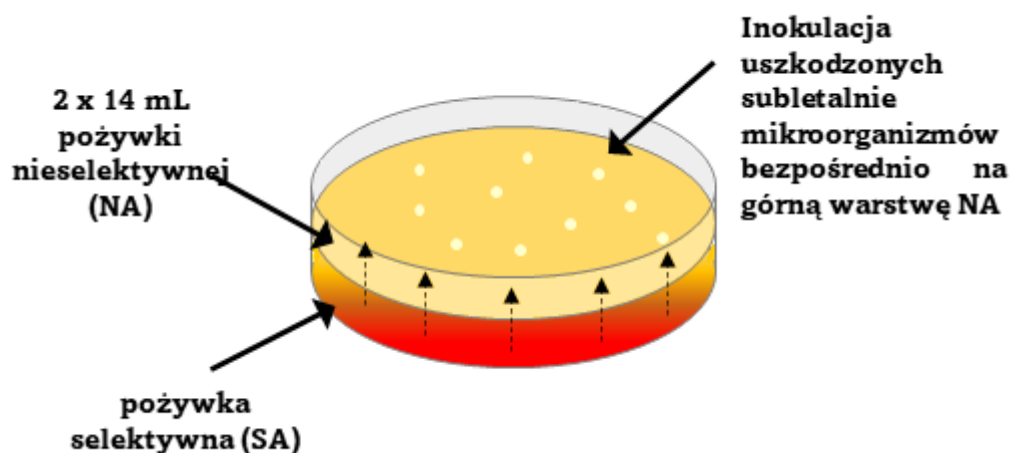
Rysunek 3. Wzrost kolonii *E. coli* na pożywce agarowej LB a) w próbie kontrolnej, b) w próbie poddanej działaniu HHP (400 MPa, 25°C, 10 min) (źródło: Kimura i wsp. 2017).

Liczebność komórek uszkodzonych subletalnie można określić na podstawie różnicy logarytmów dziesiętnych z liczby drobnoustrojów (wyrażonej w jednostkach tworzących kolonie – jtk/ml lub g) wyhodowanych na dwóch pożywkach agarowych. Pierwsza stanowi pożywkę nieselektywną umożliwiającą wzrost wszystkich żywych komórek w próbce. Druga to pożywka selektywna mająca w swoim składzie oprócz składników namnażających odpowiednie czynniki selektywne, które upośledzają zdolność mikroorganizmów do autonaprawy [Back, et al. 2012; Wuytack, i wsp. 2003]. z tego względu pożywka ta umożliwia wzrost jedynie komórkom zdrowym. Powszechnie stosowanymi czynnikami selektywnymi są m.in. NaCl, sole kwasów żółciowych, barwniki, antybiotyki, kwasy organiczne. Krytyczne stężenie czynnika selektywnego w pożywce powinno być dobrane indywidualnie do każdego rodzaju drobnoustroju zgodnie z metodą maksymalnego stężenia niehamującego w taki sposób, aby nie wpływało ono na liczbę i wygląd kolonii zdrowej populacji, czyli nie poddanej działaniu czynnika zewnętrznego. Najczęściej stosowanym czynnikiem selektywnym w doniesieniach literaturowych dotyczących uszkodzeń subletalnych komórek bakteryjnych

jest NaCl, a jego stężenie wynosi pomiędzy 4 a 7% w zależności od badanego szczepu [Wuytack, i wsp., 2003; Somolinos i wsp. 2008, Siderakou i wsp. 2021]. W oparciu o uzyskaną liczbę jtk na obydwu pożywkach agarowych możliwe jest także wyznaczenie stosunku uszkodzonej populacji względem całej populacji obliczając procentowy współczynnik uszkodzeń subletalnych (ang. sublethal ratio). Ponadto równolegle prowadzone obserwacje makroskopowe na obydwu pożywkach agarowych umożliwiają stwierdzenie czy miała miejsce regeneracja komórek uszkodzonych subletalnie czy nie. Literatura podaje, że za regenerację uważa się wzrost liczby kolonii na pożywce selektywnej bez wzrostu liczby kolonii na pożywce nieselektywnej. Jednoczesne zwiększenie liczby kolonii na obydwu typach pożywek oznacza proliferację komórek, a nie ich regenerację [Przybiski i Winter, 1979].

Idealna pożywka do oznaczania drobnoustrojów patogennych w żywności powinna umożliwić wzrost populacji o zróżnicowanym stanie fizjologicznym, przy jednoczesnym wzroście jedynie pożądanej grupy mikroorganizmów [Wu 2008]. Kang i Fung [2000] zaproponowali nowatorską, jednoetapową metodę agarową spełniającą powyższe kryteria. Płytkę dwuwarstwowa (ang. Thin Agar Layer - TAL) składa się z dwóch warstw podłoża stałego umieszczonego na szalce Petriego (rysunek 4). Pierwsza dolna warstwa stanowi odpowiednią selektywną pożywkę agarową dedykowaną dla drobnoustroju docelowego. Podczas gdy górna warstwa stanowi regenerującą pożywkę nieselektywną. Próbkę zawierającą m.in. uszkodzone subletalnie mikroorganizmy zaszczepia się bezpośrednio na nieselektywny agar. W ciągu pierwszych kilku godzin inkubacji uszkodzone komórki znajdują się w warunkach sprzyjających ich naprawie i regeneracji. Następnie składniki selektywne dyfundują przez nieselektywny agar i tworzą selektywne środowisko. Upřednio zregenerowane komórki oddziałują ze składnikami selektywnymi, które wywołują typową, charakterystyczną reakcję biochemiczną, umożliwiającą ich identyfikację, podczas gdy inne mikroorganizmy są hamowane. Skuteczność i zastosowanie metody TAL potwierdzono w wielu pracach naukowych dotyczących regeneracji drobnoustrojów uszkodzonych po obróbce termicznej niskimi temperaturami, kwasami a także wysokimi ciśnieniami dla drobnoustrojów tj. *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* [Kang i Fung, 1999; Kang i Fung, 2000; Wu i Fung, 2001; Wu i wsp., 2001a, 2001b, Tian i wsp. 2018], *Campylobacter coli* [Chang i wsp., 2003] lub *Vibrio parahaemolyticus* [Duan i wsp., 2006]. Zastosowanie metody TAL potwierdzono w badaniach z użyciem zarówno monokultur bakteryjnych jak i próbek mieszanych. W badaniach naukowych wykorzystywane są różne modyfikacje tej metody: np. pour overlay plating, surface overlay plating, agar underlay method [Shao i wsp.

2023], które różnią się między sobą kolejnością i grubością zestalonych warstw pożywek agarowych oraz czasem inkubacji.



Rysunek 4. Schemat płytki dwuwarstwowej (TAL) (źródło: opracowanie własne na podstawie Kang i Fung 1999, 2000).

1.4. Metody mikroskopowe do oceny stanu fizjologicznego komórek w populacji

Nieustający postęp technik mikroskopowych przyczynił się w znacznym stopniu do zrewolucjonizowania świata nauki. To co było niewidoczne nieuzbrojonym okiem, stało się widoczne za pomocą odpowiedniego instrumentu - mikroskopu. Mikroskopy zaczęto stosować w celu obserwacji i dogłębnej analizy populacji drobnoustrojów. Stanowiło to uzupełnienie badań naukowych i konwencjonalnych testów diagnostycznych [Gelderblom i wsp., 2000]. Pojawienie się w nauce techniki mikroskopii elektronowej (ang. electron microscopy - EM) umożliwiło uzyskanie obrazów o znacznie wyższej rozdzielczości niż w mikroskopie świetlnym. Szybki rozwój mikroskopii elektronowej wpłynął na postęp w badaniach nad budową nie tylko całych komórek, ale także subkomórkowych struktur i elementów wewnątrz nich [Bergmans i wsp., 2005]. Skaningowy mikroskop elektronowy (ang. scanning electron microscopy - SEM) generuje obrazy obiektów przestrzennych o dużej głębi ostrości. Mikrografie SEM dostarczają informacji m. in. na temat topografii, patologicznych zmian ultrastruktury. Transmisyjny mikroskop elektronowy (ang. transmission electron microscopy - TEM) ukazuje przekroje badanych obiektów pozwalając na rozróżnienie bardzo drobnych szczegółów o rozmiarach 1 nm, dzięki czemu możliwa jest obserwacja komponentów komórkowych. Zaobserwowano, że komórka bakteryjna jest strukturą o ściśle uporządkowanej organizacji, w której umiejscowienie białek i ich kompleksów podlega precyzyjnej czasowo-przestrzennej kontroli sprawowanej przez struktury białkowe o charakterze cytoszkieletowym,

a nie jak pierwotnie uważano, „zbiornikiem” wypełnionym mieszaniną białek [Donczew i wsp., 2011]. Inną metodą obrazowania komórkowego jest mikroskopia epifluorescencyjna. (ang. epifluorescent microscopy – EFM). Umożliwia wizualizację struktur w żywej komórce w czasie rzeczywistym. Mikroskopia epifluorescencyjna polega na zastosowaniu odpowiednich barwników fluorescencyjnych, które akumulują się w określonym miejscu w komórce bądź łączą z docelowym komponentem komórkowym. Sondy selektywnie absorbują i emitują światło o określonej długości fali, dzięki czemu poprzez obserwację odpowiedzi fluorofora dostarczane są informacje na temat struktury bakterii, potencjału i integralności błony, aktywności oddechowej czy aktywności enzymów wewnątrzkomórkowych [Sadowska i Grajek, 2009, Olszewska i Łaniewska-Trokenheim, 2013]. Dużym atutem mikroskopii epifluorescencyjnej jest diagnostyka wszystkich komórek bakteryjnych, nawet tych, które nie rosną na pożywkach stałych, a wykazują aktywność metaboliczną. Postęp w produkcji nowych barwników spowodował, że obecnie na rynku dostępny jest szeroki zakres pojedynczych sensorów fluorescencyjnych jak i gotowych, prostych w użyciu zestawów [Baran, 2008]. Przykładem takiego zestawu jest LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit, zawierający dwa barwniki – SYTO 9 i jodek propidyny (PI). Zestaw ten umożliwia kwalifikowanie komórek w populacji pod kątem integralności błon komórkowych. Obydwa barwniki są fluorochromami reagującymi z kwasami nukleinowymi, natomiast różnią się od siebie pod względem ich spektralnej charakterystyki oraz zdolności do penetracji przez struktury błonowe zdrowych komórek. Zgodnie z protokołem producenta, SYTO 9 penetruje do wszystkich komórek w populacji bez względu na stan ciągłości błon. Natomiast PI wybarwia komórki charakteryzujące się uszkodzeniami w strukturze dwuwarstwy fosfolipidowej. Jednoczesne zastosowanie obu barwników z zastosowaniem metod fluorescencji i odpowiedniej analizy komputerowej, umożliwia wizualne odróżnienie komórek z nieuszkodzoną błoną komórkową („żywych”, fluorescencja zielona), z uszkodzoną błoną („martwych”, fluorescencja czerwona) i posiadających uszkodzoną błonę lecz jeszcze aktywnych metabolicznie („zamierających”, fluorescencja zielona i czerwona). Jednakże metody mikroskopii epifluorescencyjnej nie są jeszcze powszechnie stosowane w badaniach żywności. Głównym problemem jest odpowiednie przygotowanie próbki polegające na elucji komórek z matrycy produktu spożywczego. Mikroskopy te wykorzystują niekonwencjonalne metody oświetlenia preparatu oraz elektroniczną obróbkę obrazu w celu ujawnienia znakowanych fluorescencyjnie składników komórki. Obecnie techniki mikroskopowe stosowane są w wielu obszarach, tam gdzie detekcja mikroorganizmów jest czynnikiem kluczowym. Znalazły one zastosowanie w analizie stanu fizjologicznego populacji

mikroorganizmów biorących udział w procesach biotechnologicznych, w patologii klinicznej, w badaniach jakości wody i żywności [Perfumo i in. 2014; Golding i in. 2016; Hameed i in. 2018]. Służą do odkrywania i identyfikacji nowych gatunków, do badania adhezji bakterii [Grin i in, 2011; González-Machado i in., 2018], oceny uszkodzeń struktur komórkowych po działaniu różnych technologii [Mackey i in, 1994; Prieto-Calvo i in, 2014; Pillet i in., 2016; Khadi i in., 2017]. Alternatywą dla mikroskopii epifluorescencyjnej jest cytometria przepływowa. Umożliwia pomiar pojedynczych komórek. Jest w stanie zobrazować złożoność i różnorodność populacji mikroorganizmów, z wyodrębnieniem poszczególnych subpopulacji. Analiza cytometryczna dostarcza informacji o parametrach strukturalnych komórki tj. integralność błony i ściany komórkowej, obecność specyficznych cząsteczek na powierzchni komórek, różnice w strukturze ściany komórkowej i funkcjonalnych tj. aktywność metaboliczna, potencjał błonowy lub aktywność komórkowych proteaz. Za pomocą cytometrii przepływowej możliwe jest także sortowanie i pozyskiwanie określonej grupy komórek do dalszych analiz. [Álvarez-Barrientos i wsp., 2000; Baran, 2008; Olszewska i wsp., 2016]. Obecnie cytometria przepływowa stosowana jest nie tylko w badaniach naukowych, ale służy głównie w analizach z zakresu diagnostyki klinicznej, transplantologii, badań środowiskowych oraz w przemyśle spożywczym [Baran, 2008].

2. HIPOTEZY I CEL PRACY

2.1. Cel główny i hipotezy badawcze

W świetle przeprowadzonych dotychczas badań wciąż aktualne pozostaje pytanie o mechanizm regeneracji komórek bakteryjnych uszkodzonych subletalnie w wyniku działania wysokiego ciśnienia i ich wpływu na stopień bezpieczeństwa utrwalonego produktu spożywczego. Jak już wiadomo wysokie ciśnienie generuje heterogeniczność populacji mikroorganizmów, co nie sprzyja wiarygodnej ocenie jakości mikrobiologicznej. Stawiając sobie za **główny cel ocenę stanu fizjologicznego komórek bakteryjnych w sokach z warzyw korzeniowych poddanych obróbce metodą HHP i przechowywanych w standardowych warunkach temperaturowych**, przeprowadzono szereg eksperymentów z użyciem konwencjonalnych i mikroskopowych metod analitycznych.

Do osiągnięcia celu głównego sformułowano trzy następujące **hipotezy badawcze**:

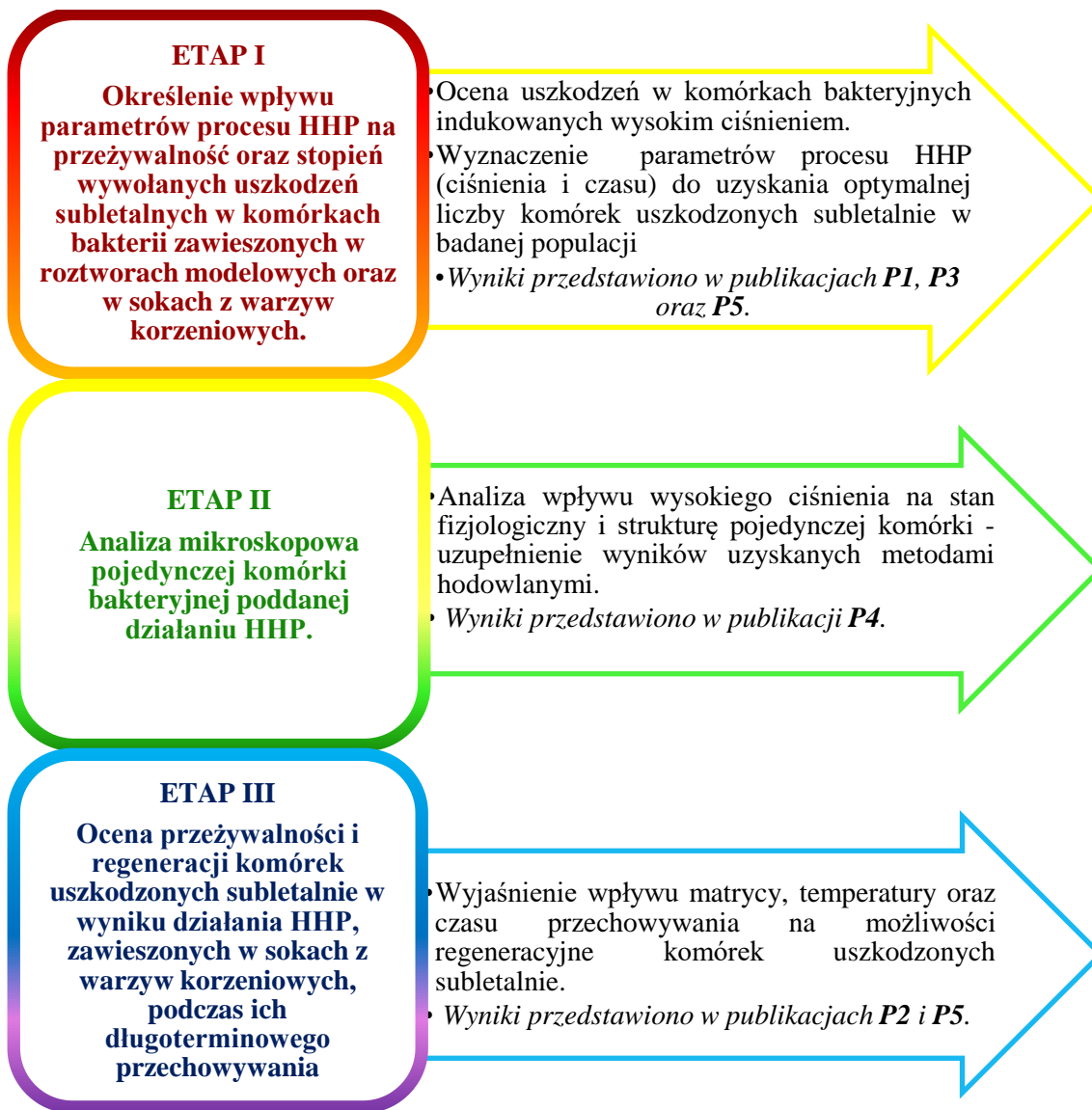
HIPOTEZA 1: Charakter medium oraz parametry procesu paskalizacji determinują rodzaj indukowanych uszkodzeń w komórkach bakteryjnych w stanie wegetatywnym.

HIPOTEZA 2: Komórki bakteryjne uszkodzone subletalnie w wyniku działania HHP regenerują się w sokach z warzyw korzeniowych w czasie ich długoterminowego przechowywania.

HIPOTEZA 3: Proces regeneracji komórek bakteryjnych uszkodzonych subletalnie zależy od rodzaju drobnoustroju, specyfiki wywołanych zmian w komórce, charakteru soku oraz temperatury przechowywania.

2.2. Etapy realizowanych badań, cele szczegółowe oraz zakres pracy

Całość pracy została podzielona na trzy etapy opisujące eksperymenty niezbędne do rozwiązania problemu badawczego. Na drodze do realizacji celu głównego wytyczono kilka celów szczegółowych, realizowanych na poszczególnych etapach pracy, które umożliwiły weryfikację postawionych hipotez. Poszczególne etapy pracy wraz z celami szczegółowymi przedstawiono na rysunku 5.



Rysunek 5. Etapy pracy oraz cele szczegółowe.

Zakres prac obejmował:

- krytyczną analizę doniesień literaturowych dotyczących badanej tematyki z uwzględnieniem czynników determinujących występowanie uszkodzeń subletalnych w populacjach bakteryjnych;
- opracowanie i wdrożenie metod analitycznych;
- przeprowadzenie procesu paskalizacji roztworów modelowych oraz soków z warzyw korzeniowych z zawieszonymi w nich szczepami bakteryjnymi;
- ocenę zastosowanych parametrów paskalizacji w badanych populacjach bakteryjnych w aspekcie powstawania uszkodzeń w tym uszkodzeń subletalnych w komórkach za pomocą metod hodowlanych;
- selekcję i dobór parametrów procesu wywołujących stan subletalny komórek bakteryjnych w celu zastosowania ich w dalszych etapach pracy;
- weryfikację dobranych parametrów procesu za pomocą metod mikroskopowych obrazujących stan fizjologiczny komórek bakteryjnych uszkodzonych subletalnie;
- realizację prób przechowalniczych kontaminowanych soków z warzyw korzeniowych po utrwalaniu metodą HHP wraz z oceną zdolności do regeneracji komórek uszkodzonych subletalnie w warunkach doświadczenia.
- zastawienie wyników badań;
- przygotowanie cyklu publikacji prezentującego uzyskane rezultaty.

3. MATERIAŁ DOŚWIADCZALNY I METODY BADAŃ

3.1. Materiał biologiczny

Listeria monocytogenes i patogenne bakterie *E. coli* zostały zidentyfikowane jako jedne z najważniejszych istotnych zagrożeń w żywności nieprzetworzonej [EFSA, 2022, Rozporządzenie Komisji Europejskiej (WE) Nr 2073/2005]. Materiałem użytym do badań były cztery szczepy bakteryjne. Dwa szczepy referencyjne: *Escherichia coli* ATCC 8739 i *Listeria innocua* CIP80.11T, oraz dwa izolaty środowiskowe pochodzące ze zbiorów własnych Zakładu Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych IBPRS wyizolowane z niepasteryzowanego soku z buraków ćwikłowych: *Escherichia coli* 61/14 i *Listeria innocua* 23/13. W pracy zastosowano niepatogenny gatunek *Listeria innocua* jako surogat patogennego gatunku *Listeria monocytogenes*. Doniesienia naukowe dowodzą, że ta bakteria jest fizjologicznie bardzo zbliżona do wcześniej wspomnianej *L. monocytogenes* i obie występują w tych samych produktach żywnościowych [Silva-Angulo i wsp. 2015, Escolar i wsp., 2017]. Przygotowanie hodowli inokulacyjnej przeprowadzono zgodnie z zasadami pracy w laboratorium mikrobiologicznym Zakładu Mikrobiologii IBPRS (szczegółowy opis znajduje się w publikacjach P1-P5).

3.2. Bufory i soki z warzyw korzeniowych

W badaniach użyto bufory McIlvaine (Sigma-Aldrich) o pH 4,0 oraz pH 7,0, a także pasteryzowane komercyjne soki z warzyw korzeniowych dostępne w handlu: sok z buraków ćwikłowych z dodatkiem kwasu cytrynowego o pH=4,0÷4,2 (Victoria Cymes, Polska) oraz sok z marchwi o pH=6,0÷6,7 (Vital Fresh, Polska).

Próbki kontrolne stanowiły bufory i soki kontaminowane monokulturami bakterii, nie poddane obróbce HHP.

3.3. Aparatura badawcza

Do przeprowadzenia procesu ciśnieniowania próbek wykorzystano stanowisko wyposażone w komorę wysokociśnieniową U 4000/65 (Unipress, IWC PAN, Warszawa) (fot. 1.) o pojemności 0,95 l, umożliwiające uzyskanie ciśnienia do 600 MPa w temperaturze od -20 do +80°C. Stanowisko było wyposażone w pomiar temperatury i ciśnienia wewnątrz komory. Medium ciśnieniowe stanowiła mieszanina wody i glikolu polipropylenowego w stosunku 1:1 (v/v). Próbki, stanowiące bufory i soki z zawieszonymi monokulturami bakterii rozlewano do handlowych, polietylenowych buteleczek o pojemności 13 ml (Sarstedt, USA). W badaniach zastosowano wysokie ciśnienie w zakresie 200-500 MPa (zwiększając ciśnienie co 100 MPa),

w różnych czasach trwania procesu: 1 min., 5 min., 10 min. Próbkę poddawano obróbce metodą HHP w temperaturze otoczenia.



Fotografia 1. Komora wysokiego ciśnienia U 4000/65 Unipress.

3.4. Metody badań

Metody analityczne zastosowane na poszczególnych etapach pracy przedstawiono na schematach postępowania (rysunki 6-8).

Liczebność komórek uszkodzonych subletalnie określono na podstawie różnicy zlogarytmowanych wyników liczby kolonii (jtk/ml) uzyskanych na pożywkach agarowych stosowanych dla danego rodzaju bakterii, posługując się równaniem (1) [Shi i wsp. 2017, Lan i wsp. 2019]. Współczynnik regeneracji R_r (ang. Recovery ratio) obliczono wg równania (2) [Lan i wsp. 2019]. Dobór stężenia NaCl został dokonany na podstawie wcześniejszych badań wykonanych w Zakładzie Mikrobiologii. Wykazano, że 5% dodatek NaCl, oceniany jako stężenie krytyczne, nie wpływa na liczbę komórek w populacji bakterii w próbach kontrolnych, nie poddanych działaniu czynnika zewnętrznego.

Poziom komórek uszkodzonych subletalnie (ang. Sublethal injuries – SI):

$$SI = \log \frac{NA_t}{SA_t} \quad (1)$$

Współczynnik regeneracji [%] (ang. Recovery ratio – R_r):

$$R_r = \frac{SA_{t(x)} - SA_{t(0)}}{NA_{t(0)} - SA_{t(0)}} \times 100\% \quad (2)$$

Do obliczenia współczynnika regeneracji R_r wyznaczono następujące założenia:

Założenie 1: $T_t = H_t + S_t$; mówiące o tym, że na populację wszystkich komórek składa się suma populacji komórek zdrowych (H) i populacji komórek uszkodzonych subletalnie (S).

Założenie 2: $T_{t(0)} = T_{t(x)} = \Delta T = \text{const.}$; mówiące o tym, że liczba wszystkich komórek w czasie nie zmienia się. W populacji zachodzi jedynie zmiana proporcji ΔH i ΔS czyli przejście z jednego stanu fizjologicznego w drugi, nie zachodzi ani proliferacja, ani wymieranie populacji.

Założenie 3: $\Delta T = \text{const.}$, jeśli różnica $\log(\text{jtk/ml}) \leq 0,25 \log$

Założenie 4: $\Delta H_t \leq S_{t(0)}$; mówiące o tym, że różnica komórek zdrowych nie może być większa niż początkowa wartość liczby komórek uszkodzonych subletalnie, w rozpatrywanym interwale czasowym.

Potencjał wzrostu (ang. growth potential - δ) obliczono posługując się równaniem 3.

$$\delta = \log(NA_{t(x)} - NA_{t(0)}) \quad (3)$$

Wyniki oceniano zgodnie z poniższym kryterium:

$\delta > 0,5 \log \text{jtk/ml}$ – możliwy wzrost bakterii

$\delta \leq 0,5 \log \text{jtk/ml}$ – mało prawdopodobny wzrost bakterii

gdzie:

NA [jtk/ml] – liczba kolonii uzyskanych na pożywce nieselektywnej

SA [jtk/ml] – liczba kolonii uzyskanych na pożywce selektywnej (pożywka z dodatkiem 5% NaCl)

t [d] – okres przechowywania

$t_{(0)}$ [d] – początek rozpatrywanego okresu przechowywania/regeneracji

$t_{(x)}$ [d] – koniec rozpatrywanego okresu przechowywania/regeneracji

Do regeneracji komórek uszkodzonych subletalnie podczas prób przechowalniczych zastosowano poniższe metody:

- PN-EN ISO 11290-2:2000 z późniejszymi zmianami. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Listeria* spp. i *L. monocytogenes*. Metoda oznaczania liczby.
- PN-EN ISO 16649-2:2004 Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby β -glukuronidazo-dodatnich *Escherichia coli*. Część 2: Metoda płytkowa w temperaturze 44 °C z zastosowaniem 5-bromo-4-chloro-3-indolilo β -D-glukuronidu.
- Metoda płytek dwuwarstwowych (Thin Agar Layer Method) wg metody Kang i Fung (1999, 2000), stanowiące kombinację pożywek TBX (agar selektywny) +TSA (agar nieselektywny) dla szczepów *E. coli* oraz ALOA (agar selektywny) + TSYEA (agar nieselektywny) dla szczepów *L. innocua*.

ETAPI

Określenie wpływu parametrów procesu HHP na przeżywalność oraz stopień wywołanych uszkodzeń subletalnych w komórkach bakterii zawieszonych w roztworach modelowych oraz w sokach z warzyw korzeniowych

Przygotowanie inokulum - monokultur szczepów bakterii:

- ożywanie szczepów w 10 ml podłoża namnażającego BHI, inkubacja 37°C/24h;
- przesiew powierzchniowy nocnej zawiesiny bakteryjnej na agarowe podłoże odżywcze TSA (*E. coli*) lub TSYEA (*L. innocua*), inkubacja 37°C/24h;
- przygotowanie subkultury polegające na zaszczerpieniu biomasą zebraną za pomocą ezy (10µl), 200 ml płynnego podłoża nieselektywnego TSB (*E. coli*) i TSYEB (*L. innocua*), inkubacja 37°C/24h;
- zawieszenie 10 ml subkultury w 200 ml świeżego płynnego podłoża nieselektywnego TSB i TSYEB, inkubacja 37°C/18h (wczesna faza stacjonarna);
- wirowanie (4000 x g, 4°C, 10 min.)
- trzykrotne przemycie osadu bakteryjnego w PBS (pH 7,2)

Zawieszenie szczepów bakterii w roztworach modelowych McIlvaine bufor pH 4,0 i pH 7,0 oraz w sokach z warzyw korzeniowych tj. w soku z buraków ćwikłowych (Victoria Cymes, pH 4,0-4,2) oraz w soku z marchwi (Vital Fresh, pH 6.0-6.7) pochodzących z handlu detalicznego. Początkowa liczebność populacji w próbce ok 1×10^7 jtk/ml

Poddanie próbek działaniu HHP w komorze wysokociśnieniowej U 4000/65 (Unipress) stosując poniższe warianty procesu:

bufory oraz sok z buraków ćwikłowych:

200 MPa (1 min., 5 min., 10 min.);

300 MPa (1 min., 5 min., 10 min.);

400 MPa (1 min., 5 min., 10 min.)

sok z marchwi:

300 MPa (1 min., 5 min., 10 min.);

400 MPa (1 min., 5 min., 10 min.);

500 MPa (1 min., 5 min., 10 min.)

Ocena liczebności badanych drobnoustrojów metodą posiewu powierzchniowego.

Do oznaczenia **wszystkich komórek w populacji** (uszkodzonych i nieuszkodzonych) stosowano podłoże nieselektywne TSA (*E. coli*) i TSYEA (*L. innocua*), inkubacja 37°C/24h

Do oznaczania **liczby komórek nieuszkodzonych** zastosowano pożywki selektywne tj. z 5% dodatkiem soli odpowiednio TSA + 5% NaCl (*E. coli*) i TSYEA + 5% NaCl (*L. innocua*), inkubacja 37°C/48 h

Wszystkie posiewy na pożywki agarowe wykonane były z dziesięciokrotnych rozcieńczeń badanej próbki.

Rysunek 6. Schemat postępowania w Etapie I

ETAP II

Analiza mikroskopowa stanu fizjologicznego komórek bakteryjnych poddanych działaniu HHP

Przygotowanie inokulum - monokultur szczepów bakterii: szczegółowa metodyka w schemacie etapu I – Rys. 6



Poddanie próbek działaniu **HHP** w komorze wysokociśnieniowej **U 4000/65** (Unipress) stosując poniższe warianty procesu:

dla szczepów *E. coli* 500 MPa/5 min

dla szczepów *L. innocua* 400 MPa/5 min



Analiza mikroskopowa stanu komórek przed i po procesie HHP przy pomocy **TEM**, **SEM**, oraz **EFM** z uprzednim barwieniem próbek zestawem LIVE/DEAD® (BacLight™ Bacterial Viability Kit, Molecular Probes).

Wizualizacja próbek w programie Lucia G version 4.82. Obróbka mikrofotografii w programie Image J software.

Obliczanie stosunku żywych/martwych komórek w próbkach dokonano za pomocą programu QuPath software 3.0.3

Rysunek 7. Schemat postępowania w Etapie II.

ETAP III

Ocena przeżywalności i regeneracji komórek uszkodzonych subletalnie w wyniku działania HHP zawieszonych w sokach z warzyw korzeniowych podczas ich długoterminowego przechowywania

Przygotowanie inokulum - monokultur szczepów bakterii: szczegółowa metodyka w schemacie etapu I – Rys. 6

Zawieszenie szczepów bakterii w sokach z warzyw korzeniowych tj. w soku z buraków ćwikłowych (Victoria Cymes, pH 4,0-4,2) oraz w soku z marchwi (Vital Fresh, pH 6.0-6.7) pochodzących z handlu detalicznego. Początkowa liczebność populacji w próbce ok 1×10^7 jtk/ml

Poddanie próbek działaniu HHP w komorze wysokociśnieniowej U 4000/65 (Unipress) stosując poniższe warianty procesu wg poniższej tabeli:

szczep	HHP	
	sok z buraków ćwikłowych	sok z marchwi
	ciśnienie / czas	
<i>Listeria innocua</i> CIP 80.11T	300 MPa/ 5 min.	400 MPa/ 5 min
<i>Listeria innocua</i> –23/13	300 MPa/ 10 min.	400 MPa/ 5 min
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	300 MPa/ 10 min.	500 MPa/ 5 min
<i>Escherichia coli</i> - 61/14	300 MPa/ 10 min.	500 MPa/ 5 min

Przechowywanie soków z warzyw korzeniowych po procesie HHP w dwóch temperaturach (5°C oraz 25°C) w czasie 4 tygodni oraz wyznaczenie potencjału wzrostu (δ) badanych drobnoustrojów..

Okresowa ocena liczebności badanych drobnoustrojów metodą posiewu powierzchniowego

- Przeżywalność szczepów analizowano w: 0, 1, 2-3, 5-7, 14, 21 i 28 dniu przechowywania.
- Do oznaczenia **wszystkich komórek w populacji** (uszkodzonych i nieuszkodzonych) stosowano podłoża nieselektywne TSA (*E. coli*) i TSYEA (*L. innocua*), inkubacja 37°C/24h
- Do oznaczania **liczby komórek nieuszkodzonych** zastosowano pożywki selektywne z dodatkiem 5% NaCl: TSA+5% NaCl (*E. coli*) i TSYEA+5%NaCl (*L. innocua*), inkubacja 37°C/48h

Dodatkowo posiewy wykonano za pomocą metod ISO oraz TAL.

- *E. coli*: TBX (inkubacja 37°C /4 h + 44°C/20 h); TAL (inkubacja 44°C/24 h)
- *L. innocua*: ALOA (1-sze rozcieńczenie w BPW 20°C/1h+inkubacja 37°C/23 h); TAL (inkubacja 37°C/24 h)

Rysunek 8. Schemat postępowania w Etapie III.

4. OSIĄGNIĘCIA BADAWCZE PRZEDSTAWIONE DO OCENY

4.1. Określenie wpływu parametrów procesu HHP oraz matrycy na przeżywalność i stopień wywołanych uszkodzeń subletalnych w komórkach bakterii *L. innocua* oraz *E. coli* (realizacja etapu I)

Przed zaakceptowaniem i wdrożeniem nowej technologii utrwalania żywności należy w pierwszej kolejności określić wpływ parametrów procesu oraz warunków środowiska (utrwalanej matrycy) na przeżywalność drobnoustrojów. Doniesienia literaturowe sugerują, że w przypadku procesu HHP nie tyle czas ekspozycji ma znaczenie co zadane ciśnienie oraz temperatura procesu [Malinowska-Pańczyk 2007]. We wstępnym etapie pracy przeprowadzono dwa eksperymenty. W pierwszym jako matryce zastosowano roztwory modelowe imitujące płynne środki spożywcze o charakterze kwaśnym i obojętnym (bufory McIlvain pH 4,0 i pH 7,0). Uzyskane wyniki posłużyły do zaplanowania kolejnego eksperymentu z zastosowaniem soków z warzyw korzeniowych o różnych pH: soku z buraków ćwikłowych (pH=4,0÷4,2) i soku z marchwi (pH=6,0÷6,7). Ocenę przeżywalności komórek po procesie HHP wraz z oceną stopnia subletalnie uszkodzonych komórek w populacji przeprowadzono metodami hodowlanymi z zastosowaniem stałych pożywek agarowych zgodnie z metodyką badań opisaną w pkt. 3.4. niniejszej pracy.

Realizację celów szczegółowych wyznaczonych dla pierwszego etapu pracy udokumentowano w trzech publikacjach. W **publikacji 1** zaprezentowano wpływ parametrów procesu na przeżywalność i liczbę uszkodzonych komórek dla badanych szczepów zawieszonych w soku z buraków ćwikłowych. Wyniki badań z wykorzystaniem dwóch szczepów *L. innocua* zawieszonych w roztworach modelowych przedstawiono w **publikacji 3**. W **publikacji 5** przedstawiono tożsame analizy dla szczepów *L. innocua* oraz *E. coli* w soku z marchwi. Wyników dla szczepów *E. coli* zawieszonych w roztworach modelowych nie opublikowano.

4.1.1. Wpływ parametrów procesu HHP na przeżywalność komórek bakteryjnych w roztworach modelowych i sokach z warzyw korzeniowych

Na tym etapie badań została określona zdolność badanych szczepów do przeżycia po procesie HHP w matrycach o odczynie kwaśnym i obojętnym.

Analiza wyników uzyskanych dla próbek roztworów modelowych wykazała istotny wpływ pH środowiska na przeżywalność badanych szczepów poddanych działaniu HHP. Uzyskane wyniki nie wykazały różnic we wrażliwości szczepów *L. innocua* (**publikacja P3**)

na działanie HHP, natomiast wykazały statystycznie istotne różnice w oporności pomiędzy szczepami *E. coli* (**wyniki nieopublikowane**). Szczep dziki *E. coli* charakteryzował się niższą wrażliwością niż szczep referencyjny.

Nie zaobserwowano wpływu czasu w zakresie ciśnienia 200-300 MPa na liczebność komórek w badanych populacjach *L. innocua* zawieszonych w buforze pH 7,0. Istotne różnice w przeżywalności pojawiły się dopiero po zastosowaniu ciśnienia 400 MPa. Po 10 minutach ekspozycji redukcja obydwu szczepów *L. innocua* wyniosła około 1,5 log (jtk/ml). W badaniach prowadzonych z zastosowaniem buforu o pH 4,0 obserwowano istotnie statystycznie różnice ($p < 0,05$) w przeżywalności szczepów *L. innocua* po działaniu ciśnienia 300 MPa. Liczebność populacji tych bakterii po 5 minutowej ekspozycji zmniejszyła się o ponad 6 log (jtk/ml) w stosunku do populacji kontrolnej. Z kolei po działaniu ciśnienia 400 MPa w czasie 1 minuty odnotowano pojedyncze kolonie w badanych próbkach.

Testy przeprowadzone w roztworze modelowym o pH 7,0 wykazały, że ciśnienie 200 MPa w czasie 1 minuty działało stymulująco na proliferację komórek obydwu szczepów *E. coli*. Szczep dziki *E. coli* 61/14 nie wykazywał wrażliwości względem HHP w zakresie zadanych parametrów. Odmienne wyniki uzyskano dla szczepu referencyjnego *E. coli* ATCC 8739. Zaobserwowano, iż poziom inaktywacji zależy zarówno od ciśnienia jak i od czasu ekspozycji (wykres 1). Podobnie jak w przypadku szczepów *L. innocua* zaobserwowano zwiększoną wrażliwość szczepów *E. coli* na działanie wysokiego ciśnienia buforze w pH 4,0. Liczebność populacji zmniejszała się wraz ze wzrostem ciśnienia i czasu ekspozycji. Odnotowano zmniejszenie liczby żywych komórek o około 2 log (jtk/ml) po działaniu 300 MPa w czasie 5 minut. Natomiast po zastosowaniu ciśnienia 400 MPa już po 1 minucie ekspozycji uzyskano wyniki poniżej granicy wykrywalności.

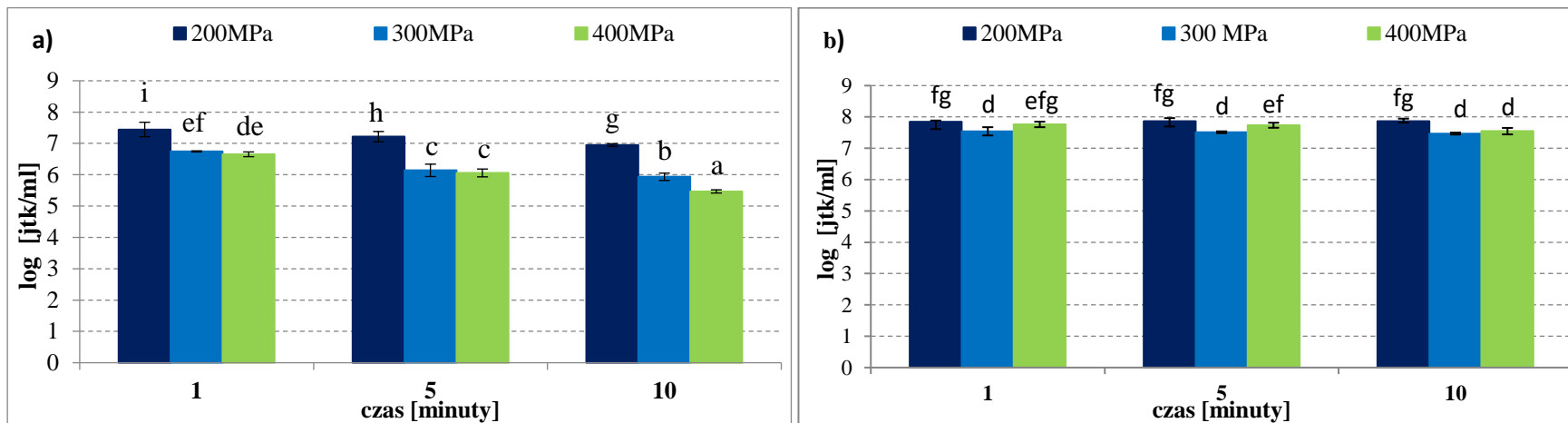
Otrzymane wyniki potwierdziły teorię, że obniżenie pH wzmacnia bakteriobójczy efekt wysokiego ciśnienia. Szczepy należące do rodzaju *E. coli*, zawieszane w buforze o odczynie kwaśnym charakteryzowały się wyższą opornością na ciśnienie w zakresie 200-300 MPa w porównaniu ze szczepami należącymi do gatunku *L. innocua*. Uzyskane wyniki stoją w opozycji do danych literaturowych, mówiących o tym, że bakterie Gram-dodatnie są bardziej odporne na działanie niekorzystnych czynników zewnętrznych [Huang i wsp., 2015].

Wyniki uzyskane w pierwszym eksperymencie stały się podstawą do dokonania wyboru parametrów procesu HHP do badań z wykorzystaniem soków z warzyw korzeniowych, stanowiących potencjalne źródło bakterii z rodzaju *Listeria* sp. oraz pałeczek *E. coli* [Sokołowska i wsp., 2011].

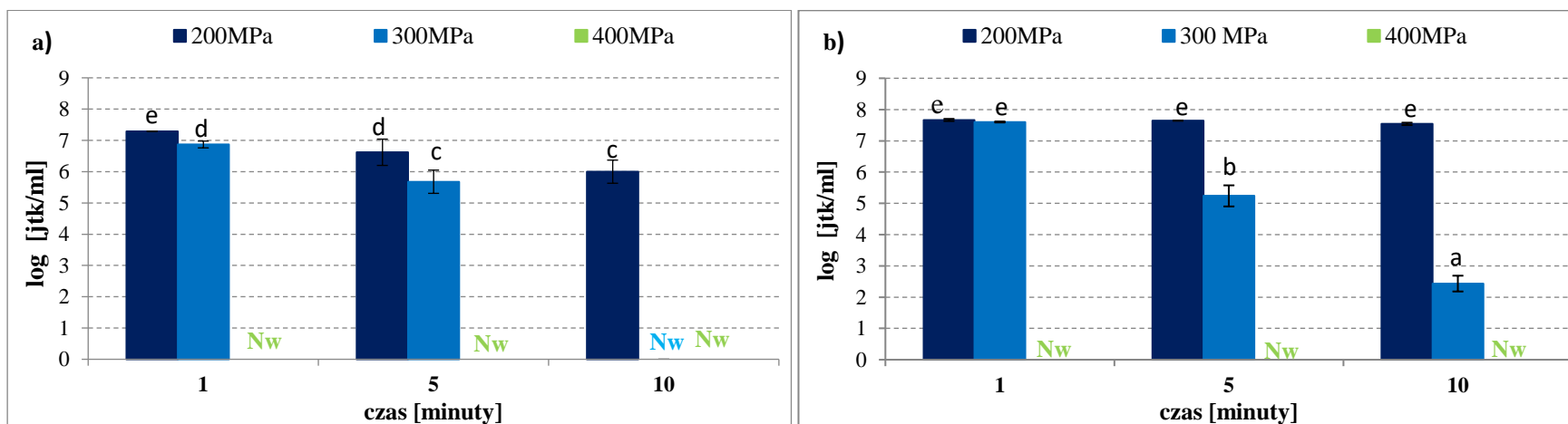
Analiza wyników uzyskanych dla próbek soków z warzyw korzeniowych wykazała, że wraz ze wzrostem ciśnienia i czasu ekspozycji liczebności badanych populacji *L. innocua* oraz *E. coli* maleje. Odnotowano różnice we wrażliwości wszystkich szczepów na działanie HHP w obydwu sokach.

W badaniach przeprowadzonych w soku z buraków ćwikłowych zastosowano taki sam zakres ciśnienia i czasu jak w przypadku buforu pH 4,0. Pomimo zbliżonej wartości pH obydwu matryc, uzyskano istotne różnice w przeżywalności bakterii w warunkach przeprowadzonego doświadczenia przy zastosowaniu tych samych parametrów procesu. Liczba inaktywowanych komórek w populacjach badanych szczepów poddanych działaniu HHP była istotnie niższa w próbkach soku z buraków ćwikłowych niż w próbkach buforu pH 4,0. Dla przykładu w **publikacji P3** przedstawiono wyniki dla szczepu referencyjnego *L. innocua* CIP80.11T, gdzie poziom redukcji po 5 minutowej ekspozycji na ciśnienie 300 MPa wyniósł 2,3 log (jtk/ml) w soku z buraków ćwikłowych i 6,2 log (jtk/ml) w buforze pH 4,0. Analogiczną zależność obserwowano w przypadku szczepu referencyjnego *E. coli* ATCC 8739. Wyniki przedstawione w **publikacji P1** wykazały, że poziom redukcji tego szczepu po działaniu ciśnienia 300 MPa w czasie 10 minut wyniósł 1,7 log (jtk/ml) w soku z buraków ćwikłowych, zaś w buforze pH 4,0 uzyskano wyniki poniżej granicy wykrywalności (wykres 2). Efekt letalny szczepu dzikiego *E. coli* 61/14 w buforze o pH 4 uzyskano po 1 minutowej ekspozycji na ciśnienie 400 MPa, zaś w soku z buraków ćwikłowych po 10 minutach działania ciśnienia. Powyższe obserwacje prawdopodobnie wynikały z faktu utworzenia warstwy ochronnej wokół komórek bakteryjnych przez związki organiczne zawarte w soku.

W badaniach przeprowadzonych w soku z marchwi (**publikacja P5**) zrezygnowano z ciśnienia 200 MPa na rzecz 500 MPa, ze względu na niski poziom inaktywacji badanych szczepów uzyskany w eksperymencie z zastosowaniem roztworu modelowego pH 7,0. Podobnie jak w przypadku soku z buraków ćwikłowych, w soku z marchwi także obserwowano ochronny wpływ matrycy organicznej na komórki bakterii. Liczba żywych komórek w populacjach badanych bakterii poddanych działaniu HHP była istotnie wyższa w próbkach soku z marchwi niż w próbkach buforu pH 7,0 przy zastosowaniu tych samych parametrów procesu. Zaobserwowano, iż w zakresie ciśnienia 400-500 MPa poziom inaktywacji szczepów *L. innocua* wzrastał wraz z wydłużaniem czasu ekspozycji. Po 10 minutach trwania procesu HHP przy ciśnieniu 400 MPa uzyskano wyniki poniżej granicy wykrywalności dla szczepu referencyjnego *L. innocua* CIP80.11T (**publikacja P5**). Szczepy z gatunku *E. coli* zawieszony w soku z marchwi wykazywały oporność na HHP w zastosowanym zakresie parametrów ciśnienia i czasu (**publikacja P5**). Maksymalną redukcję szczepów nieprzekraczającą 2 log (jtk/ml) odnotowano po działaniu ciśnienia 500 MPa w czasie 10 min.



Wykres 1. Wpływ wysokiego ciśnienia na przeżywalność *E. coli* w buforze pH 7: (a) szczep referencyjny ATCC 8739, (b) szczep dziki 61/14 (wyniki nieopublikowane).



Wykres 2. Wpływ wysokiego ciśnienia na przeżywalność *E. coli* w buforze pH 4: (a) szczep referencyjny ATCC 8739, (b) szczep dziki 61/14. Nw (nie wykryto) (wyniki nieopublikowane).¹

¹ Analizę statystyczną wyników przeprowadzono za pomocą wielowymiarowej analizy wariancji MANOVA z użyciem testu Tukey'a, przy poziomie istotności $\alpha=0,05$ używając programu Statistica w wersji 13.0 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, Kalifornia, USA). Porównania statystyczne dokonano po standaryzacji wyników uzyskanych dla obydwu szczepów w tej samej matrycy. Liczebność komórek w próbce kontrolnej (nie poddanej działaniu HHP) wynosiła $5,7 \times 10^7$ (jtk/ml).

4.1.2. Wpływ parametrów procesu HHP na wywoływanie uszkodzeń subletalnych komórek bakteryjnych

Wywoływanie uszkodzeń subletalnych (SI) drobnoustrojów w procesie HHP zostało potwierdzone badaniami naukowymi [Patterson i wsp., 1995; Alpas i wsp., 2000, Somolinos i wsp., 2008, Jofre i wsp. 2010; Sokołowska i wsp., 2014, Huang i wsp., 2014, Wang i wsp., 2016, Kimura i wsp., 2017, Wu i wsp., 2020, Yamamoto i wsp., 2021, Shao i wsp., 2023]. Jednak brakuje danych literaturowych dotyczących tego zjawiska w sokach warzywnych o niskiej kwasowości. Występowanie populacji uszkodzonej subletalnie w matrycach pokarmowych o pH bliskim obojętnemu stanowi poważny problem ze względu na możliwość regeneracji komórek w czasie długotrwałego przechowywania produktu.

Na tym etapie badań dokonano oceny wpływu parametrów procesu oraz matrycy na poziom komórek uszkodzonych subletalnie w populacji poddanej działaniu HHP. W badaniu wykazano zgodność z doniesieniami literatury, wskazującymi że metoda HHP indukuje uszkodzenia subletalne w komórkach bakterii wegetatywnych przy zastosowaniu ciśnienia poniżej 600 MPa. Maksymalny poziom uszkodzeń subletalnych we wszystkich populacjach bakterii zawieszonych w buforze pH 7,0 odnotowano po zastosowaniu 400 MPa/10 min. w warunkach przeprowadzonego doświadczenia (**publikacja P3**, tabela 1).

Maksymalny poziom komórek uszkodzonych subletalnie w buforze pH 7,0 był wyższy w populacjach bakterii *L. innocua* (2,39-3,83 log (jtk/ml)) niż w populacjach *E. coli* (0,83-1,40 log (jtk/ml)). Maksymalne poziomy uszkodzeń dla bakterii *E. coli* w buforze o pH 4,0 odnotowano przy 300 MPa/5 min (tabela 2). Z kolei najwyższy poziom uszkodzeń komórek z gatunku *L. innocua* obserwowano przy różnych parametrach HHP. Jak pokazano w **publikacji P3** dla próbek *L. innocua* zawieszonych w buforze o pH 4,0 odnotowano poziom SI wynoszący 0,81 log (jtk/ml) dla szczepu referencyjnego przy HHP 400 MPa/1 min., natomiast dla szczepu dzikiego poziom SI wynosił 0,45 log (jtk/ml) przy 300 MPa/10 min. Maksymalny poziom komórek uszkodzonych subletalnie szczepu referencyjnego *L. innocua* zawieszonych w soku z buraków ćwikłowych nie przekroczył 1 log (jtk/ml), podobnie jak w roztworze modelowym o pH 4,0 ($p \geq 0,05$). Dwukrotnie wyższy poziom uszkodzeń obserwowano w populacji szczepu dzikiego *L. innocua*, 2,34 log (jtk/ml), warunkach procesu HHP 300 MPa/10 min.

Maksymalne poziomy uszkodzeń szczepów *E. coli* zawieszonych w soku z buraków ćwikłowych odnotowano po działaniu ciśnienia 400 MPa w czasie 5 minut, odpowiednio 2,7 log (jtk/ml) oraz 4,5 log (jtk/ml) (**publikacja P1**). Dla próbek bakterii *E. coli* zawieszonych w soku marchwi maksymalne poziomy SI odnotowano przy parametrach procesu

500 MPa/10 min., odpowiednio 5,50 oraz 4,34 log (jtk/ml). Natomiast w populacjach *L. innocua* maksymalny poziom SI odnotowany po ekspozycji 400 MPa w czasie 1 min. nie przekroczył 2 log.

Analizując otrzymane wyniki stwierdzono, że dla większości badanych próbek buforów poziom wywołanych uszkodzeń subletalnych w obrębie bakterii tego samego gatunku był statystycznie niższy w populacjach szczepów dzikich. W próbkach soków z warzyw korzeniowych nie obserwowano podobnej zależności.

Wykonane analizy pozwoliły na wyznaczenie takich parametrów procesu HHP, po zastosowaniu których obserwowano uszkodzenia subletalne w komórkach badanych populacji bakterii. Uzyskane rezultaty stały się podstawą do prowadzenia dalszych badań nad oceną przeżywalności i regeneracji komórek uszkodzonych subletalnie podczas ich długoterminowego przechowywania.

Tabela.1. Poziom komórek *E. coli* uszkodzonych subletalnie w buforze pH 7 (wyniki nieopublikowane). Nw (nie wykryto)².

szczep/ parametry HHP	200 MPa			300 MPa			400 MPa		
	1 min.	5 min.	10 min.	1 min.	5 min.	10 min.	1 min.	5 min.	10 min.
<i>E. coli</i> ATCC 8739	0,60±0,33 ^c	0,43±0,20 ^d	0,60±0,23 ^c	-0,14±0,09 ^g	-0,06±0,03 ^g	0,41±0,15 ^d	0,38±0,07 ^d	0,83±0,03 ^b	1,40±0,08 ^a
<i>E. coli</i> 61/14	-0,02±0,01 ^g	0,00±0,00 ^{fg}	0,12±0,06 ^e	0,13±0,03 ^e	0,18±0,01 ^e	0,18±0,02 ^e	0,07±0,04 ^f	0,14±0,5 ^e	0,83±0,13 ^b

Tabela.2. Poziom komórek *E. coli* uszkodzonych subletalnie w buforze pH 4 (wyniki nieopublikowane) Nw (nie wykryto)².

szczep/ parametry HHP	200 MPa			300 MPa			400 MPa		
	1 min.	5 min.	10 min.	1 min.	5 min.	10 min.	1 min.	5 min.	10 min.
<i>E. coli</i> ATCC 8739	0,28±0,06 ^c	0,00±0,00 ^e	0,92±0,16 ^a	0,43±0,05 ^b	5,68±0,37 ³	Nw	Nw	Nw	Nw
<i>E. coli</i> 61/14	0,06±0,01 ^c	0,31±0,02 ^{bc}	0,37±0,05 ^b	0,19±0,03 ^{cd}	5,24±0,34 ³	2,43±0,25 ³	Nw	Nw	Nw

² Analizę statystyczną wyników przeprowadzono za pomocą wielowymiarowej analizy wariancji MANOVA z użyciem testu Tukey'a, przy poziomie istotności $\alpha=0,05$ używając programu Statistica w wersji 13.0 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, Kalifornia, USA). Porównania statystycznego dokonano dla wyników uzyskanych w tej samej macierzy dla dwóch szczepów.

³ Wszystkie żywe komórki w populacji stanowią komórki uszkodzone subletalnie.

4.2. Analiza mikroskopowa stanu fizjologicznego komórek bakteryjnych poddanych działaniu HHP (realizacja etapu II)

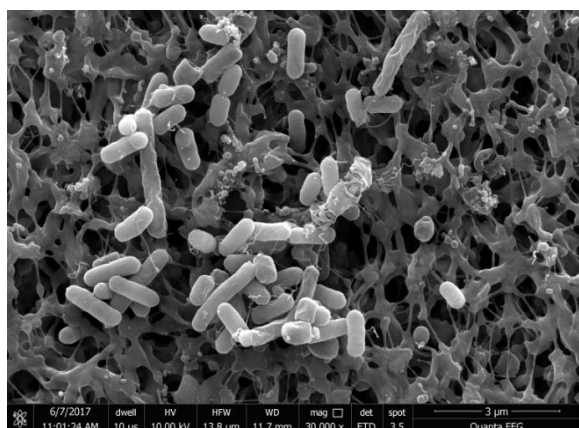
Aby dokładniej poznać odpowiedź bakterii *L. innocua* oraz *E. coli* na oddziaływanie wysokiego ciśnienia, przeprowadzono badania monitorujące zmiany w morfologii komórek. Zmiany te oceniano za pomocą analitycznych metod mikroskopowych: SEM, TEM oraz EFM. Doboru parametrów procesu HHP zastosowanych w tej części pracy dokonano w oparciu o wyniki uzyskane w etapie I w mediach o pH obojętnym. Kryterium wyboru parametrów procesu HHP były: redukcja komórek poniżej 5 log (jtk/ml) oraz poziom wywołanych uszkodzeń subletalnych w komórkach bakterii powyżej 1 log (jtk/ml). Zastosowano dwa warianty parametrów HHP: 400 MPa/5 min dla szczepów *L. innocua* i 500 MPa/5 min dla szczepów *E. coli*. Szczepy analizowano w buforze PBS o pH 7,4. Uzyskane wyniki stanowiły realizację celu szczegółowego wyznaczonego dla drugiego etapu pracy i udokumentowano je w **publikacji 4**. Szczegółowy opis metod analitycznych oraz zastosowanego oprogramowania do obróbki wyników przedstawiono w wymienionej publikacji. Przy interpretacji wyników skupiono się przede wszystkim na zmianach strukturalnych komórki w tym na dezintegracji komponentów komórkowych oraz na procentowym udziale komórek w populacji, wykazujących permeabilizację osłon komórkowych. Wyniki te stanowią uzupełnienie do rezultatów uzyskanych w I etapie pracy.

Przeprowadzone analizy pozwoliły na ocenę stanu fizjologicznego komórek bakterii poddanych działaniu HHP oraz ukazanie charakteru zachodzących zmian strukturalnych w odniesieniu do komórek nie poddanych działaniu ciśnienia. Mikrofotografie wykonane pod mikroskopem elektronowym SEM umożliwiły ocenę cech mikrostrukturalnych badanych bakterii, przede wszystkim ich kształtu oraz wielkości komórek. Komórki *L. innocua* były pałeczkami o podłużnym kształcie osiągające długość od 0,9 μm do 1,1 μm dla, o gładkiej powierzchni błon. Natomiast komórki *E. coli* osiągały długość od 1,3 μm do 2,0 μm i cechowały się charakterystyczną, nieregularną powierzchnią ściany komórkowej. Mikrofotografie próbek kontrolnych pod mikroskopem elektronowym TEM ukazywały komórki o wyglądzie reprezentatywnym dla zdrowej populacji. Obserwowano wyraźnie zaznaczone właściwe błony komórkowe o gładkiej, nieprzerwanej powierzchni oraz zintegrowane wewnątrz komórki. Jasne miejsca w cytoplazmie, widoczne na przekrojach poprzecznych oznaczały rejony, w których skupiony był genofor bakterii.

Analiza mikrofotografii próbek poddanych działaniu HHP umożliwiła stwierdzenie, że wysokie ciśnienie indukuje zmiany w budowie komórek na poziomie strukturalnym. W obrazach wykonanych pod mikroskopem elektronowym SEM zaobserwowano zmianę

w topografii komórek w postaci utraty kształtu poprzez zapadnięcie, ściśnięcie, a nawet rozerwanie struktury komórki. Przekroje podłużne widziane na fotografiach uzyskanych w mikroskopie elektronowym TEM, uwidocznily zmiany w organizacji przestrzennej komórki. Nie zaobserwowano przerwania ciągłości osłon komórkowych dla trzech analizowanych szczepów. Wyjątek stanowił szczep dziki *L. innocua* 23/12. Nie odnotowano różnic w charakterze zmian w komórkach w obrębie całej populacji. W komórkach szczepów *E. coli* zaobserwowano skrajną kondensację i agregację cytoplazmy w rejonu okołobłonowe, prawdopodobnie świadczące o zdenaturowanych białkach cytoplazmatycznych. Zjawisko to także występowało w komórkach *L. innocua*, jednakże w znacznie mniejszym stopniu. Zaburzenia strukturalne zaobserwowano także w organizacji rejonu materiału genetycznego. Znaczącą dezintegrację kwasu nukleinowego odnotowano w komórkach szczepów *E. coli*. Łagodniejszy charakter zmian materiału genetycznego odnotowano dla szczepów *L. innocua*. Wykazano zgodność obserwacji uzyskanych przy użyciu obydwu technik mikroskopii elektronowej. Zmiany w komponentach komórkowych wywołane wysokim ciśnieniem miały łagodniejszy charakter w komórkach bakterii Gram - dodatnich niż Gram - ujemnych. Podobne zjawiska opisano w innych publikacjach, w których stosowane były wysokie ciśnienia w zakresie 300-600 MPa [Prieto-Calvo i in. 2014; Moussa i in. 2007; Yang i in. 2012; Hsu i in. 2014].

a)



b)

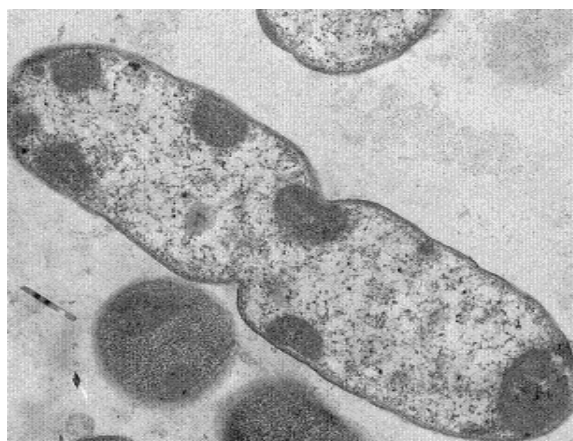


Fotografia 2. *L. innocua* CIP 80.11T w obrazie mikroskopu a) SEM i b) TEM, po działaniu HHP 400 MPa/5 min. (wyniki opublikowane w publikacji P4).

a)



b)



Fotografia 3. *E. coli* 8739 w obrazie mikroskopu a) SEM i b) TEM, po działaniu HHP 500 MPa/5 min. (wyniki opublikowane w publikacji P4).

Jak pokazano w **publikacji P4**, żywotność populacji badanych szczepów testowano dodatkowo za pomocą EFM metodą barwienia fluorescencyjnego. W tym celu użyto zestawu dwóch fluorochromów PI oraz Syto[®]9. W pracy wyznaczono stosunek komórek żywych i martwych w badanych populacjach. W wyniku analizy zdjęć próbek kontrolnych wykonanych za pomocą EFM zaobserwowano heterogeniczność populacji bakterii. W obrazie mikroskopowym odnotowano pojedyncze, luźno ułożone komórki wykazujące zieloną fluorescencję. Takie wybarwienie komórek świadczy o zachowaniu ciągłości ich osłon komórkowych.

Analiza barwionych próbek po zastosowaniu HHP pozwoliła stwierdzić niejednorodność populacji badanych szczepów. W obrazach mikroskopowych obserwowano konglomeraty złożone z mieszaniny zielonych i czerwonych komórek. Wybarwienie komórek na kolor czerwony świadczy o przerwaniu ciągłości błony. Ze względu na fakt utworzenia skupisk komórek po procesie HHP, zliczenie pojedynczych komórek nie było możliwe. Dlatego też podjęto decyzję o wyliczeniu procentowego stosunku żywych i martwych komórek (ang. Live/Dead - L/D) w badanych populacjach na podstawie wyliczonego pola powierzchni, osobno dla mikrofotografii uzyskanych przy zastosowaniu odpowiedniej pary filtrów dla zielonej i czerwonej fluorescencji. Stosunek L/D szczepu referencyjnego *L. innocua* CIP80.11T był wyższy niż w przypadku szczepu typu dzikiego *L. innocua* 23/13. Wynosił odpowiednio 69% do 31% oraz 55% do 45%. z kolei populacje *E. coli* charakteryzowały się podobnym stosunkiem L/D. Połowa komórek w populacjach wykazywała czerwoną fluorescencję. Powyższe wyniki potwierdzają obserwacje uzyskane za pomocą technik mikroskopii elektronowej.

4.3. Analiza przeżywalności i regeneracji komórek uszkodzonych subletalnie w sokach z warzyw korzeniowych poddanych działaniu HHP, podczas długoterminowego przechowywania (realizacja etapu III).

Kluczowym elementem pracy było uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy komórki bakteryjne uszkodzone subletalnie w wyniku działania HHP mogą się regenerować w sokach z warzyw korzeniowych w czasie ich długoterminowego przechowywania, a jeżeli tak to czy proces ten zależy od rodzaju drobnoustroju, specyfiki uprzednio wywołanych zmian w komórce, charakteru soku oraz temperatury przechowywania. Wyniki pracy stanowiły realizację celu szczegółowego wyznaczonego dla trzeciego etapu pracy i zostały przedstawione w **publikacji 2**. Dodatkowym elementem pracy była ocena możliwości wzrostu (odzysku) komórek subletalnie uszkodzonych na podłożach selektywnych stosowanych w znormalizowanych metodach ISO oraz z wykorzystaniem metody płytek dwuwarstwowych TAL. Reprezentatywne wyniki zostały zamieszczone w **publikacji 5**.

Przed przystąpieniem do badań przechowalniczych dla każdej próbki (tj. szczepu i matrycy) dobrano jeden zestaw parametrów HHP (ciśnienie i czas ekspozycji) (tabela 2). Selekcję parametrów dokonano na podstawie wyników uzyskanych w etapie I, a kryterium stanowiły: (i) redukcja komórek poniżej 5 log (jtk/ml), (ii) poziom wywołanych uszkodzeń subletalnych w komórkach bakterii powyżej 1 log (jtk/ml). Próbkę analizowano okresowo za pomocą konwencjonalnych metod mikrobiologicznych, wykorzystując pożywki selektywne i nieselektywne opisane w metodyce (pkt 3.4.).

Tabela 2. Parametry HHP zastosowane w próbach przechowalniczych soków z warzyw korzeniowych.

szczep	parametry HHP	
	sok z buraków ćwikłowych	sok z marchwi
	ciśnienie [MPa] / czas ekspozycji [minuta]	
<i>Listeria innocua</i> CIP 80.11T	300/5	400/5
<i>Listeria innocua</i> 23/13	300/10	400/5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	300/10	500/5
<i>Escherichia coli</i> 61/14	300/10	500/5

4.3.1. Próbkki kontrolne (nie poddane działaniu HHP)

Na podstawie wyników uzyskanych dla prób kontrolnych stwierdzono, że sok z marchwi przechowywany w temperaturze 5°C promował wzrost szczepów *L. innocua* ($\delta_{28-0} > 0,05 \log$ (jtk/ml)). Liczebność obydwu populacji zwiększyła się o ponad 1,8 log (jtk/ml) w odniesieniu do wartości początkowych. Dla pozostałych próbek soków z warzyw korzeniowych zawierających szczepy *L. innocua* uzyskano potencjał wzrostu poniżej wartości 0,05 log (jtk/ml). W próbkach soku z marchwi pomiędzy 14 a 21 dniem przechowywania w temperaturze 25°C obserwowano zmniejszenie liczby bakterii w badanych populacjach *L. innocua*. W 21 dobie uzyskano wynik poniżej granicy wykrywalności. Obumieranie populacji wiązało się z obniżeniem wartości pH soku marchwiowego. Parametr ten zmniejszył się o 2 jednostki w odniesieniu do wartości wyjściowej tj. z pH 6,2 do 4,2. Nastąpiły zmiany parametrów sensorycznych tj. barwy i zapachu. Możliwym wyjaśnieniem tego zjawiska mogą być przemiany chemiczne zawartych w soku z marchwi składników organicznych, prowadzące do powstania nowych związków o niskim pH. Prawdopodobnie zmiana charakteru matrycy wpłynęła na produkcję szkodliwych metabolitów przez bakterie, co w rezultacie doprowadziło do wymierania komórek w populacji. Wyjaśnienie zaobserwowanego zjawiska wymagałoby szczegółowej analizy zmiany składu chemicznego soku przez cały okres przechowywania próbki. Szczepy *E. coli* uznano za niezdolne do wzrostu w obydwu sokach z warzyw korzeniowych w zastosowanych temperaturach ($\delta \leq 0,05 \log$ (jtk/ml)), co oznacza, że obydwa soki nie wspomagały wzrostu tych bakterii.

W trzecim etapie pracy dokonano szczegółowej analizy zachodzących zmian w populacjach bakterii poddanych działaniu HHP. W tym celu oceniano zmiany w liczebności: (i) całej populacji (ΔT), (ii) populacji zdrowej (ΔH) oraz (iii) populacji uszkodzonej subletalnie (ΔS). Klucz do opisu i analizy zachodzących zmian przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Klucz do szczegółowej analizy zmian zachodzących w populacji bakterii.

Zachodzące zmiany w populacjach	Opis zachodzących zmian w populacji	Współczynnik regeneracji R_r
$T(0)=T(x)=\text{const}$ $\Delta T=0; \Delta H\uparrow; \Delta S\downarrow$	<ul style="list-style-type: none"> • zachodzi jedynie zmiana proporcji ΔH i ΔS czyli przejście z jednego stanu fizjologicznego w drugi. • brak proliferacji • brak wymierania • regeneracja populacji uszkodzonej subletalnie 	R_r (wartość dodatnia)
$T(0)=T(x)=\text{const}$ $\Delta T=0; \Delta H\downarrow; \Delta S\uparrow$	<ul style="list-style-type: none"> • zachodzi jedynie zmiana proporcji ΔH i ΔS czyli przejście z jednego stanu fizjologicznego w drugi. • brak proliferacji • brak wymierania • populacja zdrowa została wtórnie uszkodzona subletalnie 	R_r (wartość ujemna)
$T(0)=T(x)=\text{const}$ $\Delta T=0; \Delta H=0; \Delta S=0$	<ul style="list-style-type: none"> • faza zastoju lub liczba kolonii poniżej poziomu wykrywalności 	$R_r = 0$
$T(0)\neq T(x)$ $\Delta T\downarrow; \Delta H\uparrow; \Delta S\downarrow$	<ul style="list-style-type: none"> • część populacji uszkodzonej subletalnie mogła się zregenerować • część populacji uszkodzonej subletalnie mogła zostać wtórnie uszkodzona letalnie • możliwa proliferacja populacji zdrowej 	niemożliwe wyliczenie R_r
$T(0)\neq T(x)$ $\Delta T\downarrow; \Delta H\downarrow; \Delta S\uparrow$	<ul style="list-style-type: none"> • wymieranie populacji • część populacji uszkodzonej subletalnie mogła zostać wtórnie uszkodzona letalnie 	niemożliwe wyliczenie R_r
$T(0)\neq T(x)$ $\Delta T\downarrow; \Delta H\downarrow; \Delta S\downarrow$	<ul style="list-style-type: none"> • wymieranie populacji • brak proliferacji • brak regeneracji 	niemożliwe wyliczenie R_r
$T(0)\neq T(x)$ $\Delta T\downarrow; \Delta H\downarrow; \Delta S=0$	<ul style="list-style-type: none"> • wymieranie populacji • brak proliferacji • brak regeneracji 	niemożliwe wyliczenie R_r
$T(0)\neq T(x)$ $\Delta T\downarrow; \Delta H=0; \Delta S\downarrow$	<ul style="list-style-type: none"> • wymieranie populacji • brak proliferacji • część populacji uszkodzonej subletalnie mogła zostać wtórnie uszkodzona letalnie • brak regeneracji 	niemożliwe wyliczenie R_r
$T(0)\neq T(x)$ $\Delta T\downarrow; H=0; \Delta S\downarrow$	<ul style="list-style-type: none"> • brak komórek zdrowych w populacji • wszystkie żywe komórki w populacji stanowią komórki uszkodzone subletalnie • wymieranie populacji 	niemożliwe wyliczenie R_r
$T(0)\neq T(x)$ $\Delta T\uparrow; \Delta H\uparrow; \Delta S=0$	<ul style="list-style-type: none"> • proliferacja komórek zdrowych • brak komórek uszkodzonych subletalnie w populacji 	niemożliwe wyliczenie R_r
$T(0)\neq T(x)$ $\Delta T\uparrow; \Delta H\uparrow; \Delta S\downarrow$	<ul style="list-style-type: none"> • proliferacja komórek zdrowych • część populacji uszkodzonej subletalnie mogła się zregenerować 	niemożliwe wyliczenie R_r

4.3.2. Próbkki soku z marchwi poddane działaniu HHP

Publikacja P2 to artykuł poświęcony rozważaniom i analizie nad oceną przeżywalności i regeneracji komórek uszkodzonych subletalnie w wyniku działania HHP, zawieszonych w sokach z warzyw korzeniowych (z buraków ćwikłowych oraz z marchwi), podczas ich długoterminowego przechowywania.

Analizując próbki soku z marchwi przechowywane w temperaturze 5°C wykazano, że w pierwszych czterech dobach przechowywania uszkodzone subletalnie komórki obydwu szczepów *L. innocua* uległy regeneracji. Wartości współczynnika regeneracji R_r mieściły się w zakresie od 0,9% do 66%. Po krótkiej fazie zastoju, między 1 a 4 dobą, obserwowano proliferację komórek w obydwu populacjach *L. innocua*. Na tym etapie nie odnotowano już komórek uszkodzonych subletalnie. Po 21 dobie nastąpiła faza stacjonarna, zaś liczba komórek w badanych populacjach szczepów *L. innocua* wynosiła około 9 log (jtk/ml). Potencjał wzrostu w 28 dniu analizy wynosił 3,65 dla szczepu referencyjnego *L. innocua* CIP 80.11T oraz 2,98 dla szczepu dzikiego *L. innocua* 23/13. W próbkach soku z marchwi przechowywanych w temperaturze 25°C początkowo obserwowano gwałtowną proliferację komórek obydwu szczepów bakterii *L. innocua*. Szczegółowa analiza wyników sugerowała, że część populacji uszkodzonej subletalnie mogła się zregenerować ($\Delta T \uparrow$; $\Delta H \uparrow$; $\Delta S \downarrow$). W następnych dniach odnotowano stopniowe wymieranie komórek, zaś w 21 dobie stwierdzono, że liczba komórek w badanych populacjach jest poniżej granicy wykrywalności. Obserwowano podobne zjawisko obniżenia pH soku, jak w próbach kontrolnych. Potencjał wzrostu w 28 dniu analizy był ujemny.

Całkowita liczba komórek w populacjach szczepów *E. coli* zawieszonych w soku z marchwi zmniejszała się sukcesywnie przez cały okres przechowywania w temperaturze 5°C ($\delta_{28-0} \leq 0,5$). Obserwowano wymieranie populacji szczepu referencyjnego *E. coli* ATCC 8739. W przypadku szczepu dzikiego *E. coli* 61/14 odnotowano przejście komórek ze stanu uszkodzenia subletalnego w stan komórki zdrowej przy zachowaniu stałej wartości ΔT oraz regenerację komórek uszkodzonych subletalnie w poszczególnych interwałach czasowych ($R_r < 6,5\%$). Redukcja szczepu dzikiego *E. coli* 61/14 była istotnie niższa w odniesieniu do szczepu referencyjnego *E. coli* ATCC 8739. W próbkach soku z marchwi przechowywanych w temperaturze 25°C w pierwszej dobie obserwowano proliferację komórek zdrowych w obydwu populacjach *E. coli*. Następnie wystąpiła faza, w której odnotowano zmiany w proporcjach ΔH i ΔS regenerację komórek uszkodzonych subletalnie. Współczynnik regeneracji R_r mieścił się w zakresie od 6,5% do 39%. W końcowym okresie przechowywania nastąpiło powolne obniżanie liczby bakterii w obydwu populacjach ($\delta_{28-0} \leq 0,5$).

4.3.3. Próbkę soku z buraków ćwikłowych poddane działaniu HHP.

W publikacji P2 podsumowano także wyniki uzyskane w ramach wykonania testów przechowalniczych soku z buraków ćwikłowych.

Analizując próbki przechowywane w temperaturze 5°C obserwowano sukcesywny spadek liczby komórek w populacjach wszystkich badanych szczepów bakterii przez pierwsze 3 tygodnie. Dalsze wydłużenie czasu skutkowało zwiększeniem liczby komórek w populacjach *E. coli* do poziomu około 2 log (jtk/ml). Odmienne wyniki uzyskano dla szczepów *L. innocua*, gdzie w 28 dniu liczebność obydwu populacji była poniżej granicy wykrywalności. Najprawdopodobniej niskie pH soku przyczyniło się do wtórego uszkodzenia populacji uszkodzonej subletalnie i stanowiło czynnik bójący. Regeneracja komórek uszkodzonych subletalnie nie występowała ($R_r < 0$).

W pierwszych 7 dniach przechowywania próbek soku z buraków ćwikłowych w temperaturze 25°C obserwowano wymieranie populacji wszystkich bakterii. Wyznaczone potencjały wzrostu miały wartości ujemne, co oznacza, że wzrost bakterii w soku z buraków ćwikłowych był mało prawdopodobny. Dalsza analiza zmian stanu fizjologicznego bakterii *L. innocua* była trudna do zinterpretowania ze względu na psucie się soku. Obserwowano naprzemiennie zmniejszanie i zwiększanie liczby bakterii w populacjach. Uzyskane wyniki dla szczepu referencyjnego *E. coli* wskazywały na możliwość występowania wtórnych uszkodzeń subletalnych w populacji między 1 a 4 dobą przechowywania ($\Delta T=0$; $\Delta H\downarrow$; $\Delta S\uparrow$). Regeneracja komórek uszkodzonych subletalnie wystąpiła jedynie między 4 a 7 dobą ($R_r > 1,3\%$). W kolejnych dniach obserwowano zmniejszanie liczby komórek, zaś w 28 dniu analizy uzyskano wynik poniżej granicy wykrywalności. Odmienne wyniki uzyskano dla szczepu dzikiego *E. coli*. Między 7 a 14 dobą odnotowano wzrost całkowitej liczby komórek w populacji o 1,5 log (jtk/ml). Poziom komórek uszkodzonych subletalnie nie zmienił się istotnie statystycznie w tym przedziale, zatem najprawdopodobniej doszło nie do regeneracji, ale do namnożenia komórek ($\Delta T\uparrow$; $\Delta H\uparrow$; $\Delta S=0$).

4.3.4. Odzysk komórek uszkodzonych subletalnie na pożywkach agarowych

Publikacja P5 stanowi opis rozważań nad oceną zastosowanych pożywek selektywnych do wykrywania komórek uszkodzonych subletalnie w wyniku działania HHP. Analiza mikroskopowa z wykorzystaniem EFM wykazała, że w komórkach poddanych działaniu HHP doszło do przerwania ciągłości błon komórkowych. Uszkodzenie błony komórkowej skutkuje utratą funkcji osmoregulacyjnych [Mackey i wsp., 1994], co w efekcie prowadzi do zahamowania wzrostu na pożywkach selektywnych [Wesche i wsp. 2009]. Z uwagi na powyższy fakt, dokonano okresowej oceny liczebności komórek uszkodzonych

subletalnie w próbkach soków z warzyw korzeniowych podczas ich przechowywania, stosując pożywki ALOA i TBX. Odzysk, szybkość wzrostu oraz morfologię komórek na pożywkach selektywnych porównywano z wynikami uzyskanymi na płytkach dwuwarstwowych TAL przygotowanych zgodnie z pkt. 3.4. niniejszej pracy. Porównanie miało na celu ocenę możliwości zastosowania płytek dwuwarstwowych TAL do prawidłowej oceny bezpieczeństwa mikrobiologicznego badanych soków z warzyw korzeniowych poddanych działaniu HHP.

Dla większości analizowanych próbek traktowanych wysokim ciśnieniem, liczba kolonii *L. innocua* uzyskanych na selektywnej pożywce ALOA nie różniła się istotnie statystycznie od liczby kolonii uzyskanych na płycie dwuwarstwowej TAL ($p \geq 0,05$). Ponadto różnice w liczbie kolonii na pożywce nieselektywnej TSYEA i płycie dwuwarstwowej TAL nie przekroczyły wartości $0,43 \log$ (jtk/ml). Po 24 godzinnej inkubacji uzyskano kolonie wykazujące charakterystyczne cechy, tj. wzrost, specyficzną barwę oraz typową morfologię kolonii zarówno na ALOA jak i na TAL. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że obydwie zastosowane metody umożliwiły wzrost nie tylko populacji zdrowej, ale także populacji uszkodzonej subletalnie. Niestety zmiany wprowadzone do znowelizowanego w 2017 roku dokumentu PN-EN ISO 11290 nie uwzględniają etapu wstępnej regeneracji komórek uszkodzonych polegającego na 1 godzinnej inkubacji próbki w bulionie namnażającym w temperaturze 20°C .

W przypadku oznaczenia liczby *E. coli* wg PN-EN ISO 16649-2:2004 na pożywce TBX dla większości analizowanych próbek traktowanych wysokim ciśnieniem obserwowano słabszy wzrost niż na płycie dwuwarstwowej TAL. Różnice między wynikami uzyskanymi dla szczepu referencyjnego *E. coli* na TAL i TBX mieściły się w zakresie od $0,05$ do $0,88 \log$ (jtk/ml). Liczba kolonii na TAL była istotnie niższa niż na pożywce nieselektywnej TSA ($p < 0,05$). Uzyskane wyniki sugerują, że metoda PN-EN ISO 16649-2:2004 niesie ze sobą ryzyko niedoszacowania wszystkich żywych komórek w próbce. Prawdopodobnie nastąpiło zahamowanie wzrostu komórek uszkodzonych subletalnie, spowodowane obecnością w pożywce chromogennego składnika – 5-bromo-4-chloro-3-indolilo β -D-glukuronidu. Niemniej jednak na obydwu selektywnych pożywkach po 24-godzinnej inkubacji uzyskano kolonie wykazujące charakterystyczne cechy, tj. wzrost, specyficzną barwę oraz typową morfologię kolonii.

5. STWIERDZENIA I WNIOSKI.

Niniejsza praca miała na celu ocenę uszkodzeń indukowanych w komórkach bakteryjnych w wyniku działania wysokiego ciśnienia hydrostatycznego ze szczególnym uwzględnieniem możliwości regeneracji komórek uszkodzonych subletalnie w czasie długoterminowego przechowywania produktu, stanowiącego soki z warzyw korzeniowych. Zarówno cel główny jak i cele szczegółowe pracy zostały osiągnięte.

Analizy z zastosowaniem metod płytkowych oraz z wykorzystaniem metod mikroskopowych pozwalają na stwierdzenie, że komórki bakterii zawieszane w roztworach modelowych i sokach poddanych działaniu HHP w zakresie 300-500 MPa zostały uszkodzone zarówno na poziomie letalnym jak i subletalnym. Analiza mikroskopowa potwierdziła, że HHP indukuje zmiany w komponentach komórkowych w obszarze cytoplazmy i genomu bakteryjnego. Potwierdzono, że stopień inaktywacji badanych szczepów zwiększa się wraz ze wzrostem zadanego ciśnienia. Natomiast nie w każdym przypadku wydłużenie czasu procesu przy zachowaniu stałego ciśnienia skutkowało zmniejszeniem liczby żywych komórek w populacji. Nie udało się jednoznacznie określić zależności między poziomem wywołanych uszkodzeń subletalnych, a parametrami procesu i rodzajem matrycy. Zatem nie da się przewidzieć w jakim stopniu komórki bakteryjne zostaną uszkodzone subletalnie po procesie HHP. W związku z powyższym, zawsze należy brać pod uwagę możliwość wystąpienia tego zjawiska podczas obróbki metodą HHP. W przeprowadzonych doświadczeniach udowodniono, że charakter medium ma wpływ na przeżywalność populacji poddanej działaniu wysokiego ciśnienia. Obserwowano ochronny wpływ związków organicznych zawartych w sokach na zawieszane w nich komórki bakterii. Ich inaktywacja w sokach była mniejsza niż w buforach. Ponadto uzyskane wyniki sugerują, że pochodzenie szczepów ma wpływ na ich wrażliwość względem działania HHP. Wymaganą przez FFSA (2022) redukcję o 5-8 log, zapewniającą bezpieczeństwo mikrobiologiczne żywności utrwalanej metodami alternatywnymi, osiągnięto w warunkach doświadczenia dla: matryc płynnych o odczynie kwaśnym przy zastosowaniu parametrów procesu HHP 400 MPa / 10 min., zaś dla matryc płynnych o odczynie obojętnym przy zastosowaniu parametrów procesu HHP powyżej 500 MPa / 10 min. Uzyskane wyniki badań nie odpowiadają ogólnemu stwierdzeniu, że bakterie Gram-ujemne są bardziej wrażliwe na stres wywołany wysokim ciśnieniem niż bakterie Gram-dodatnie. Co prawda analizy prowadzono na ograniczonej liczbie izolatów mogących wykazywać specyficzne cechy szczepowe, nie mniej jednak w przeprowadzonym doświadczeniu nie potwierdzono teorii

literaturowej dotyczącej (szeregu oporności) zależności między dwoma grupami bakterii, a jej wrażliwością na działanie HHP.

Przeprowadzone badania potwierdziły hipotezę 1, stanowiącą o tym, że charakter medium oraz parametry procesu paskalizacji determinują rodzaj indukowanych uszkodzeń w komórkach bakteryjnych, aczkolwiek nie da się jednoznacznie określić zależności parametrów HHP i charakteru medium względem poziomu wywołanych uszkodzeń subletalnych.

Badania typu „shelf life” miały na celu pozyskanie wiedzy jak w analizowanych próbkach soków zmienia się poziom komórek uszkodzonych subletalnie podczas przechowywania w obydwu zastosowanych temperaturach. Wyniki prac przeprowadzonych w trzecim etapie badań pozwoliły na weryfikację dwóch pozostałych hipotez. W efekcie zrealizowanych badań wykazano, że niskie pH soku z buraków ćwikłowych nie determinowało zmiany w liczebności komórek w populacjach prób kontrolnych. Niemniej jednak obserwowano wymieranie populacji badanych szczepów traktowanych wysokim ciśnieniem w czasie 4- tygodniowego przechowywania w temperaturze 5°C. Obserwowano zarówno zwiększenie jak i zmniejszenie liczby komórek w badanych populacjach w całym analizowanym okresie przechowywania w temperaturze 25°C, a charakter tych zmian był różny w zależności od szczepu. Nie obserwowano regeneracji komórek uszkodzonych subletalnie w badanych populacjach bakterii w próbkach soku z buraków ćwikłowych. Wykazano, że sok z marchwi wspomaga wzrost komórek *L. innocua* podczas przechowywania w warunkach chłodniczych. Obserwowano regenerację komórek uszkodzonych subletalnie w wyniku działania HHP w soku z marchwi dla próbek: *L. innocua* w temperaturze 5°C oraz dla *E. coli* w obydwu temperaturach. Zatem, dla soku z marchwi **potwierdzono hipotezę 2, w której założono, że komórki bakteryjne uszkodzone subletalnie w wyniku działania HHP regenerują się w soku w czasie ich długoterminowego przechowywania.** Potwierdzono hipotezę 3 stanowiącą o tym, że **proces regeneracji komórek bakteryjnych uszkodzonych subletalnie zależy od rodzaju drobnoustroju, specyfiki wywołanych zmian w komórce, rodzaju soku oraz temperatury przechowywania.** Niniejsze rozważania prowadzą do wniosku, że aby osiągnąć standardy jakości i bezpieczeństwa żywności przetworzonej pod wysokim ciśnieniem, szczególną uwagę należy zwrócić na potencjalną obecność komórek uszkodzonych subletalnie. Strefa między obrażeniami śmiertelnymi i subletalnymi to prawdopodobnie „cienka linia”. Niedoszacowanie liczby komórek żywych przy użyciu pożywek selektywnych może być szczególnie niebezpieczne w przypadku patogenów przenoszonych przez żywność. Dlatego pożywki typu TAL powinny być stosowane przy

kontroli jakości produktów poddanych łagodnym procesom przetwarzania, w których możliwe jest pojawienie się komórek uszkodzonych subletalnie i ich regeneracja w trakcie przechowywania. Uzyskane wyniki mogą przyczynić się do nowelizacji międzynarodowych standardów służących do wykrywania patogenów w żywności metodami nietermicznymi w ramach obowiązującej kontroli jakości.

Wnioski i obserwacje:

1. Zastosowanie parametrów HHP tj. ciśnienie w zakresie 300-500 MPa i czas ekspozycji do 10 minut, indukowało uszkodzenia subletalne w komórkach badanych populacji bakterii należących do gatunku *L. innocua* oraz *E. coli*.
2. Poziom wywołanych uszkodzeń letalnych w badanych populacjach bakterii korelował dodatnio z parametrami procesu HHP i zależał od pH matrycy.
3. Poziom wywołanych uszkodzeń subletalnych badanych populacjach bakterii nie był jednoznacznie zależny od parametrów procesu HHP ani od pH matrycy.
4. Rodzaj matrycy, temperatura przechowywania oraz rodzaj drobnoustroju miały wpływ na proces regeneracji komórek uszkodzonych subletalnie podczas 4-tygodniowego przechowywania.
5. Sok z buraków ćwikłowych o odczynie kwaśnym działał hamująco na wzrost populacji bakterii poddanych procesowi HHP, w czasie przechowywania w temperaturze 5°C i 25°C.
6. Sok z marchwi przechowywany w temperaturze 5°C wykazywał właściwości promujące wzrost szczepów *L. innocua*.
7. Regeneracja komórek bakterii uszkodzonych subletalnie w wyniku działania HHP jest możliwa w soku z marchwi o odczynie bliskim obojętnemu.
8. Otrzymane w pracy wyniki badań potwierdzają zasadność zastosowania płytek dwuwarstwowych TAL do oceny bezpieczeństwa mikrobiologicznego badanych soków z warzyw korzeniowych poddanych działaniu HHP.

6. BIBLIOGRAFIA:

1. GUS, 2020, Produkcja i handel zagraniczny produktami rolnymi w 2019 r. Analizy statystyczne. Publikacja dostępna na stronie internetowej <http://stat.gov.pl>
2. Borowska J., 2003, Owoce i warzywa jako źródło naturalnych przeciwutleniaczy. *Przem. Ferm. i Owoc.- Warzyw.*, 5: 11-12,
3. Sokołowska B., Chotkiewicz M., Niezgodą J., Dekowska A., 2011, Ocena zanieczyszczenia mikrobiologicznego świeżych, niepasteryzowanych, wyciskanych soków owocowych i warzywnych dostępnych w handlu. *ZPPNR*, 569, 219-228
4. Suarez-Jacobo A., Rufer C. E., Gervilla R., Guamis B., Roig-Sages A. X., Saldo J., 2011, Influence of ultra-high pressure homogenisation on antioxidant capacity, polyphenol and vitamin content of clear apple juice. *Food Chem.* 127, 447-454.
5. Wang C.-Y., Huang H.-W., Hsu C.-P., Yang B. B., 2016, Recent advances in food processing using high hydrostatic pressure technology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 56, no. 4, 527–540
6. Farkas D. F., 2016, A short history of research and development efforts leading to the commercialization of high-pressure processing of foods. w *High Pressure Processing of Food*, V. M. Balasubramaniam, G. V. Barbosa-C' anovas, H. L. M. Lelieveld, Eds., 19–36, Principles, technology and applications, *Springer*, New York, NY, USA.
7. Huang H.-W., Wu S.-J., Lu J.-K., Shyu Y.-T., Wang Ch.-Y., 2017, Current status and future trends of high-pressure processing in food industry. *Food Control*, vol. 72, Part A, 1-8, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.019>
8. Hać – Szymańczuk E., Mroczek J., 2006, Perspektywy techniki wysokich ciśnień w przemyśle spożywczym. *Przem. Spoż.*, 4, 24 -27
9. Malinowska-Pańczyk E., Kołodziejska I., 2010, Możliwości zastosowania wysokiego ciśnienia w przemyśle owocowo-warzywnym, *ŻYWNOSĆ. Nauka. Tech. Jakość*, 2 (69), 5 – 15
10. Torress Bello E.F., González Martínez G., Klotz Ceberio B.F., Rodrigo D., Martínez López A. 2014, High Pressure Treatment in Foods. *Foods*, 3, 476–490. <https://doi.org/10.3390/foods3030476>.bGelderblom,
11. Balakrishna A.K., Wazed M.A., Farid M.A., 2020, Review on the Effect of High Pressure Processing (HPP) on Gelatinization and Infusion of Nutrients. *Molecules*, 25, 2369. <https://doi.org/10.3390/molecules25102369>.
12. Malinowska-Pańczyk E., Kołodziejska I., 2007, High pressure induced changes in microorganisms' cells. *Med. Wet.*. 63. 1285-1290.
13. Prieto-Calvo M., Prieto M., Lopez M., Alvarez-Ordóñez A., 2014, Effects of high hydrostatic pressure on *Escherichia coli* ultrastructure, membrane integrity and molecular composition as assessed by FTIR spectroscopy and microscopic imaging techniques. *Molecules*, 19, 21310–21323.
14. Hsu H.Y., Sheen S., Sites J., Huang L., Wu J.S., 2014, Effect of high pressure treatment on the survival of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in strawberry puree. *Food Microbiol.*, 40, 25–30.
15. Huang H.W., Lung H.M., Chang Y.H., Yang B.B., Wang C.Y., 2015, Inactivation of pathogenic *Listeria monocytogenes* in raw milk by high hydrostatic pressure. *Foodborne Pathog. Dis.*, 12, 139–144. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1871>.
16. Hoover D.G., Metrick C., Papineau A.M., Farkas D.F., Knorr D., 1989, Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Tech.*, 43, 99–107

17. Wouters P.C., Glaasker E., Smelt J.P.P.M., 1998, Effects of high pressure on inactivation kinetics and events related to proton efflux in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:509-514.
18. Pagán R, Mackey B., 2000, Relationship between membrane damage and cell death in pressure-treated *Escherichia coli* cells: differences between exponential- and stationary-phase cells and variation among strains. *Appl Environ Microbiol.*, 66(7):2829-34. [https://doi: 10.1128/AEM.66.7.2829-2834.2000](https://doi.org/10.1128/AEM.66.7.2829-2834.2000)
19. Maldonado J.A., Schaffner D.W., Cuitiño A.M., Karwe M.V., 2016, In situ studies of microbial inactivation during high pressure processing. *High Pressure Res.*, 36, 79–89. <https://doi.org/10.1080/08957959.2015.1111887>.
20. European Food Safety Administration, 2022, The efficacy and safety of high-pressure processing of food, <https://doi: 10.2903/j.efsa.2022.7128>
21. Baj J., Markiewicz Z, 2015, *Biologia molekularna bakterii*. Nowe wydanie. PWN
22. Wesche A.M., Gurtler J.B., Marks B.P., Ryser E.T., 2009, Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *J Food Protect* ,72: 1121–1138. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.5.1121>
23. Evrendilek G.A., 2012, *Microbial stress response to high pressure processing: Stress Response of Foodborne Micro-organisms*, Wong, H-CH., Nova Science Publishers, Inc., Nova Novinka; UK ed. Edition.
24. Sztucki D., 2019, Mikroorganizmy a stres środowiskowy - czynniki hamujące i stymulujące rozwój bakterii. *Laboratorium – Przegląd Ogólnopolski*, 4, 29-34
25. Somolinos M, García D, Pagán R, Mackey B., 2008, Relationship between sublethal injury and microbial inactivation by the combination of high hydrostatic pressure and citral or tert-butyl hydroquinone. *Appl Environ Microbiol.*, 74(24):7570-7. <https://doi: 10.1128/AEM.00936-08>.
26. Espina L, García-Gonzalo D, Pagán R., 2016, Detection of Thermal Sublethal Injury in *Escherichia coli* via the Selective Medium Plating Technique: Mechanisms and Improvements. *Front Microbiol.*,7:1376. <https://doi: 10.3389/fmicb.2016.01376>.
27. Siderakou D, Zilelidou E, Poimenidou S, Tsipra I, Ouranou E., Papadimitriou K., Skandamis P., 2021, Assessing the survival and sublethal injury kinetics of *Listeria monocytogenes* under different food processing-related stress. *Int J Food Microbiol.*, 346: 109159, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109159>
28. Hochman A., 1997, Programmed Cell Death in Prokaryotes. *Critical Reviews in Microbiol.*, 23(3), 207–214, <https://doi:10.3109/10408419709115136>
29. Hurst A., 1977, Bacterial injury: a review. *Can J Microbiol.*, 8:935-44, <https://doi: 10.1139/m77-139>.
30. Wu D., Forghani F., Banan-Mwine Daliri E., Li J., Liao X., Liu D., Ye X., Chen S., Ding T., 2020, Microbial response to some nonthermal physical technologies. *Trends in Food Scie. and Techn.*, 95, 107-117
31. Huang H.-W., Lung H.-M., Yang B.B., Wang C.-Y., 2014, Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing. *Food Control.*, 40 (1), 250–259.
32. Yamamoto K., Zhang X., Inaoka T., Morimatsu K., Kimura K., Nakaura Y., 2021, Bacterial Injury Induced by High Hydrostatic Pressure. *Food Eng Rev.*, 13, 442–453, <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09271-8>
33. Wu V.CH., 2008, A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiol.*, 25: 735–744, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.011>
34. Rozporządzenie Komisji Europejskiej (WE) Nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych.
35. Serraino A., Giacometti F., 2014, Introduction to challenge test and microbiological characterisation of local products. *Italian J. Food Safety*, vol. 3, no.1, 34-35

36. Guidance Note No. 18, 2017, Validation of product shelf-life, Revision 3, Food Safety Authority of Ireland.
37. Kimura K, Morimatsu K, Inaoka T., Yamamoto K., 2017, Injury and recovery of *Escherichia coli* ATCC 25922 cells treated by high hydrostatic pressure at 400–600 MPa. *J Biosci Bioeng.*, 123(6):698–706
38. Mackey B.M., Forestière K., Issaacs N.S., Stenning R., Brooker B., 1994, The effect of high hydrostatic pressure on *Salmonella* Thompson and *Listeria monocytogenes* examined by electron microscopy. *Lett. Appl. Microbiol.*, 19, 429–432.
39. Back K.H., Kim S.O., Park K.H., Chung M.S., Kang D.H., 2012, Spray method for recovery of heat-injured *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.*, 75(10), 1867–1872, <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-512>
40. Wuytack, E.Y., Phuong L.D., Aertsen A., Reyns K.M., Marquenie D., De Ketelaere B., Michiels C.W., 2003, Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by heat and by different nonthermal treatments. *J. Food Protect.*, 66(1), 31–37, <https://doi.org/10.4315/0362-028x-66.1.31>
41. Przybilski K.S., Witter L.D., 1979, Injury and recovery of *Escherichia coli* after sublethal acidification. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 37, 261e265.
42. Kang D.H, Fung D.Y.C., 1999, Thin agar layer method for recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. *J Food Protect.*, 62: 1346–1349, <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.11.1346> doi: 10.4315/0362-028X-62.11.1346
43. Kang D.H., Fung D.Y.C., 2000, Application of thin agar layer method for recovery of injured *Salmonella* Typhimurium. *Int. J. Food Microbiol.* 54:127–132, [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00174-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00174-9) doi: 10.1016/S0168-1605(99)00174-9
44. Wu V.C.H., Fung D.Y.C., 2001, Evaluation of thin agar layer method for recovery of heat-injured foodborne pathogens. *J Food Sci.*, 66: 580–583, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04605.x> doi: 10.1111/j.1365-2621.2001.tb04605.x
45. Wu V.C.H., Fung D.Y.C., Kang D.H., 2001a, Evaluation of thin agar layer method for recovery of cold-injured foodborne pathogens. *J Rapid Meth Auto Microbiol.*, 9: 11–25.
46. Wu V.C.H., Fung D.Y.C., Kang D.H., Thompson L.K., 2001b, Evaluation of thin agar layer method for recovery of acid-injured foodborne pathogens. *J Food Prot.*, 64: 1067–1071.
47. Chang V.P., Mills E.W., Cutter C.N., 2003, Comparison of recovery methods for freeze-injured *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Campylobacter coli* in cell suspensions and associated with pork surfaces. *J Food Prot.*, 66: 798–803. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.5.798> doi: 10.4315/0362-028X-66.5.798
48. Duan J., Liu C., Su Y.C., 2006, Evaluation of a double layer agar plate for direct enumeration of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Food Sci.*, 71: M77–M82. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb08911.x> doi: 10.1111/j.1365-2621.2006.tb08911.x
49. Shao L., Sun Y., Zou B., Zhao Y., Li X., Dai R., 2023, Sublethally injured microorganisms in food processing and preservation: Quantification, formation, detection, resuscitation and adaptation. *Food Res. Int.*, 165, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112536>
50. Gelderblom H.R, Hazelton P.R., 2000, Specimen collection for electron microscopy. *Emerg. Infect. Dis.*, 6, 433–434.
51. Bergmans L., Moisiadis P., Van Meerbeek B., Quirynen M., Lambrechts P., 2005, Microscopic observation of bacteria: re-view highlighting the use of environmental SEM. *Int. Endodontic J.*, 38 (11), 775–788, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2005.00999.x>
52. Donczew M., Ginda K., Zakrzewska-Czerwińska J., Jakimowicz D., 2011, Solving the mysteries of the bacterial cell application of novel techniques in fluorescence microscopy. *Postepy Hig. Med. Dośw.*, 65, 114–123

53. Sadowska J., Grajek W., 2009, Analiza stanu fizjologicznego pojedynczych komórek bakterii za pomocą barwienia fluorescencyjnego. *Prace przeglądowe*, 4, (87), 102-114.
54. Olszewska M., Łaniewska-Trokenheim Ł., 2013, Metody fluorescencyjnego barwienia komórek w badaniach stanu fizjologicznego bakterii. *Post. Mikrobiol.*, 52,4,409-418.
55. Baran J., 2008, Nowa epoka cystometrii przepływowej - przewodnik po współczesnych cytometriach i ich zastosowanie. *Postępy Biol. Kom.*, 35 (24): 3-15
56. LIVE/DEAD®BacLight™ Bacterial Viability Kit Protocol. Dostępny na stronie internetowej: <https://www.thermofisher.com/pl/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/live-dead-baclight-bacterial-viability-protocol.html>, 17.10.2021
57. Perfumo A., Elsaesser A., Littmann S., Foste R.A., Kuypers M.M.M., Cockell C.S., Kminek G., 2014, Epifluorescence, SEM, TEM and nanoSIMS image analysis of the cold phenotype of *Clostridium psychrophilum* at subzero temperatures. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 90, 869–882.
58. Golding C.G., Lamboo L.L., Beniac D.R., Booth T.F., 2016, The scanning electron microscope in microbiology and diagnosis of infectious disease. *Sci. Rep.*, 6, 26516
59. Hameed S., Xie L., Ying, Y., 2018, Conventional and emerging detection techniques for pathogenic bacteria in food science: A review. *Trends Food Sci. Technol.*, 81, 61–73.
60. Grin I., Schwarz H., Linkeet D., 2011, Electron microscopy techniques to study bacterial adhesion. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 715, 257–269.
61. González-Machado C., Capita, R., Riesco-Peláez F., Alonso-Calleja C., 2018, Visualization and quantification of the cellular and extracellular components of *Salmonella* Agona biofilms at different stages of development. *PLoS ONE*, 3, e0200011.
62. Pillet F., Formosa-Dague C., Baaziz H., Dague E., Rols M.P., 2016, Cell wall as a target for bacteria inactivation by pulsed electric fields. *Sci. Rep.*, 6, 19778.
63. Khadi N., Raj Upreti A., Li Y., 2017, Simultaneous bacterial inactivation and degradation of an emerging pollutant under visible light by ZnFe₂O₄ co-modified with Ag and rGO. *RSC Adv.*, 7, 27007–27016.
64. Álvarez-Barrientos A., Arroyo J., Cantón R., Nombela C., Sánchez-Pérez M., 2000, Applications of Flow Cytometry to Clinical Microbiology. *Clinical Microbiol. Rev.*, 13(2): 167–195.
65. Olszewska M., Kocot A., Łaniewska-Trokenheim Ł., 2016, Analiza cytometryczna w mikrobiologicznych badaniach żywności. *Med. Weter.*, 72(3), 162-167
66. Escolar C., Gómez D., Ruiz-García M.D.R., Conchello P., Herrera A., 2017, Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* isolated from ready-to-eat products of animal origin in Spain. *Foodborne Pathogens and Diseases*, 14(6), 357–363.
67. Silva-Angulo A.B., Zanini S.F., Rosenthal A., Rodrigo D, Klein G, Martinez A., 2015, Comparative study of the effects of citral on the growth and injury of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* cells. *PLoS One* 10, e0114026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114026>
68. Shi H., Chen Z., Chen D., Kan J., 2017, Sublethal injury and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 and K-12 after exposure to lactic acid. *Food Cont.* 82, 190-195
69. Lan L., Zhang R., Zhang X., Shi H., 2019, Sublethal injury and recovery of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 after exposure to slightly acidic electrolyzed water. *Food Cont.* 106, 106746
70. PN-EN ISO 11290-2:2000 z późniejszymi zmianami. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Listeria* spp. i *L. monocytogenes*. Metoda oznaczania liczby.

71. PN-EN ISO 16649-2:2004 Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby β -glukuronidazo-dodatnich *Escherichia coli*. Część 2: Metoda płytkowa w temperaturze 44 °C z zastosowaniem 5-bromo-4-chloro-3-indolilo β -D-glukuronidu.
72. PN-EN ISO 11133:2014-07/A2:2020-10 Mikrobiologia żywności, pasz i wody -- Przygotowanie, produkcja, przechowywanie i przeprowadzanie badań żywności
73. Patterson M.F, Quinn M., Simpson R., Gilmour A., 1995, Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatments in phosphate – buffered saline and foods. *J. of Food Protect.*,58(5), 524–529.
74. Alpas H., Kalchayanand N., Bozoglu F., Ray B., 2000, Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure – resistant and pressure – sensitive strains of foodborne pathogens. *Int. J. of Food Microbiol.*, 60, 33–42.
75. Jofré A., Aymerich T., Bover-Cid S., Garriga M., 2010, Inactivation and recovery of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* after high hydrostatic treatments up to 900 MPa. *Int. Microbiol.*, 13(3), 105–112.
76. Wang C.Y., Huang H.W., Hsu C.P., Yang B.B., 2016, Recent advances in food processing using high hydrostatic pressure technology. *Critic. Rev. in Food Scie. and Nutrition*, 56(4), 527–540.
77. Sokołowska B., Skąpska S., Niezgoda J., Rutkowska M., Dekowska A., Rzoska S.J., 2014, Inactivation and sublethal injury of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* by high hydrostatic pressure in model suspensions and beetroot juice. *High Pressure Res.*, 34(1), 147–155.
78. Moussa M., Perrier-Cornet J.-N., Gervais P., 2007, Damage in *Escherichia coli* Cells Treated with a Combination of High Hydrostatic Pressure and Subzero Temperature. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 6508–6518.
79. Yang B.W., Shi Y., Xia X.D., Xi M.L., Wang X., Ji B.Y., Meng J.H., 2012, Inactivation of foodborne pathogens in raw milk using high hydrostatic pressure. *Food Control*, 28(2), 273–278

7. ANEKS

KOPIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ WRAZ Z OŚWIADCZENIAMI WSPÓLAUTORÓW

1. **Nasiłowska J.**, Sokołowska B., Fonberg-Broczek M. The impact of high hydrostatic pressure on inactivation and sublethal injury of foodborne pathogens in beetroot juice. *Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego*. 2016, vol. 71, no. 1, pp. 21–27
2. **Nasiłowska J.**, Sokołowska B., Fonberg-Broczek M. Long-term storage of vegetable juices treated by high hydrostatic pressure: Assurance of the microbial safety. *BioMed Research International* 2018, 2, doi.org/10.1155/2018/7389381
3. **Nasiłowska J.**, Sokołowska B., Fonberg-Broczek M. Behavior of *Listeria innocua* strains under pressure treatment – in-activation and sublethal injury. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 2019, 69(1), 45–52, doi: 10.31883/pjfns-2019-0004
4. **Nasiłowska J.**, Kocot A., Osuchowska P. N., Sokołowska B. High-pressure-induced sublethal injuries of food pathogens—microscopic assessment. *Foods* 2021, 10(12), 2940 doi:10.3390/foods10122940
5. **Nasiłowska J.**, Sokołowska B., Fonberg-Broczek M. *Escherichia coli* and *Listeria innocua* stability in carrot juice preserved by high hydrostatic pressure. *AIMS Agriculture and Food* 2022, 7(3), 623-636, doi: 10.3934/agrfood.20220039

Publikacja 1

Nasiłowska J., Sokołowska B., Fonberg-Broczek M. (2016)

The impact of high hydrostatic pressure on inactivation and sublethal injury of foodborne pathogens in beetroot juice. *Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego*, 71(1), 21–27

THE IMPACT OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE ON INACTIVATION AND SUBLETHAL INJURY OF FOODBORNE PATHOGENS IN BEETROOT JUICE

Justyna Nasilowska¹, Barbara Sokołowska¹, Monika Fonberg-Broczek²

¹ Prof. Waclaw Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology, Department of
Fruit and Vegetable Technology, 36 Rakowiecka str., 02-532 Warsaw, Poland

nasilowska@ibprs.pl

² Institute of High Pressure Physics of Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

Summary

High hydrostatic pressure (HHP) is a well known method currently used for food preservation. Nevertheless this treatment can also cause sublethal injury of foodborne pathogen cells, which could repair and become potentially dangerous for consumers. The survival of *Listeria innocua* CIP80.11T, *Escherichia coli* ATCC 8739 and the wild strains isolated from beetroot juice after HHP treatment (200 MPa, 300 MPa and 400 MPa) as well as the level of sublethal injuries in the surviving cells were investigated in this study. Lethal effect was reported after treatment at 400 MPa for the most of strains. The maximum level of sublethal injuries was reported after 5 minutes under pressure 300 MPa (*L. innocua*) and 400 MPa (*E. coli*).

Key words: *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, high hydrostatic pressure, beetroot juice, sublethal injury

INTRODUCTION

Fresh fruits and vegetables as well as fruit and vegetable juices that are consumed without any thermal treatment, and are contaminated of *Listeria* with more than 100 cfu/g, are considered to be a direct risk to human health. Exceeding this number is dangerous especially for people with reduced immunity, children, the elderly and pregnant women, causing listeriosis and even sepsis [Goulet et al. 2008]. Some serotypes of *E. coli* can cause serious food poisoning and be very dangerous for human health.

Because of the numerous health benefits, fresh beetroot juice became more and more fashionable nowadays. Root vegetable juices are the most contaminated among commercially available raw, freshly squeezed juices [Sapers 2003, Sokołowska et al. 2011, Sokołowska et al. 2012]. Sokołowska et al. (2011) showed that among investigated juices of this kind 41% contained *Listeria monocytogenes* and 57% of tested samples included *Escherichia coli*.

High Hydrostatic Pressure (HHP) is a nonthermal food preservation method which reduces the microbial counts, ensures microbiological safety and does not markedly change the sensory and nutritional attributes of products [Bayindirli et al. 2006, Buzrul et al. 2008, Marszałek et al. 2014, Żyngiel et al. 2009]. HHP is used worldwide for the preservation of several commercial products, including fruit juices.

The level of microbial injury by HHP treatment depends on microbial physiology factors such as growth phase, species type as well as pH. Presence of particles in product can also modify the effect of HPP on microorganisms. The mechanism of microbial inactivation by HHP is related to the cell morphological changes, cytoplasmic membrane modification, damage of genetic mechanism and adverse biochemical reaction [Hoover et al. 1989]. This damages can be reversible or irreversible, affecting the integrity and functionality of membrane and generate sublethally injured cells under some treatment conditions [Wesche et al. 2009]. An indirect way to evaluate the number of sublethally injured cells is the use of plating technique on selective medium with NaCl addition [Mackey 2000, Yuste et al. 2004], because immediately after HHP processing damaged cells have no or lower ability to grow on this medium.

The aim of this work was to investigate the effect of high hydrostatic pressure on inactivation and sublethal injury of foodborne pathogens, *Listeria innocua* and *Escherichia coli*, suspended in beetroot juice

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms and growth conditions

E. coli ATCC 8739, *L. innocua* CIP80.11T and the wild strains isolated from beetroot juice (*E. coli* 61/14 and *L. innocua* 23/13) used in this study were stored in Cryobank at temperature $-27^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$. Broth subcultures were prepared by inoculating a tube containing 10 mL of sterile Brain – Heart Infusion medium (BHI) (bioMerieux) with a single culture immobilized on sterile bead. After inoculation, tubes were incubated in 37°C for 24 h and then each overnight culture was moved with 0.1 ml loop on Petri dish with Tryptic Soy agar (TSA) (Biocar Diagnostics) or Tryptic Soy Yeast Extract agar (TSYE) (Biocar Diagnostics) respectively. Next, culture from plate was added to 250 mL Erlenmeyer flasks containing 200 mL of Tryptic Soy Broth (TSB) (Biocar Diagnostics) or Tryptic Soy Broth Yeast Extract (TSBYE) (Biocar Diagnostics) to prepare the second subculture, and incubated at 37°C for 18 h to yield stationary phase culture. Then the cultures were harvested by centrifugation ($4000 \times g$, 10 min., 4°C). The sedimented cells were aseptically re-suspended into phosphate-

buffered saline (PBS, pH 7.2) and again centrifuged. The washing procedure was repeated twice more. After that, model suspensions of *E. coli* and *L. innocua* were prepared in PBS. Just before HHP treatment commercial beetroot juice acidified with citric acid (pH from 3.98 to 4.17, produced by Victoria Cymes, Poland) was inoculated with bacteria cells in concentration ca. 6 log cfu/mL and transferred into sterile polyethylene tubes (Sarstedt) in 13 mL portions in duplicate.

HHP treatment

The samples were exposed to high pressure treatment at the Institute of High Pressure Physics, The Polish Academy of Science, using apparatus U 4000/65 (Unipress). The volume of the treatment chamber was 0.95 L and the maximum working pressure 600 MPa. The pressure-transmitting fluid used was distilled water and polypropylene glycol (1:1). The working temperature of the apparatus ranged from -10°C to $+80^{\circ}\text{C}$. Samples were subjected to hydrostatic pressure of 200, 300 and 400 MPa at 20°C and held for 1, 5 and 10 min. The pressurization times reported do not include the come-up and come-down time. The temperature was measured in the chamber.

Analytical methods

HHP-treated samples were analyzed immediately after processing. The viability of each strain was assayed by counting colony-forming units. Ten-fold serial dilutions in Tryptone Salt broth (Biokar Dignostics) of each sample were prepared. Appropriate dilutions of samples were spread on agars. Counts of total viable cells were determined by spread plate on TSA/TSYE agar. TSA/TSYE agar with 5% NaCl (POCh) were used to determine non-injured cells in population. This was the maximum concentration of NaCl that caused no reduction in the colony count of unstressed cells of *E. coli* and *L. innocua* strains. The difference between the viable and non-injured cells was used to estimate the number of sublethally injured survivors. As a control samples buffers and beetroot juice containing *E. coli* and *L. innocua*, without HHP treatment, were also analyzed. Plate with TSA/TSYE agar were incubated for 24 h at 37°C , and TSA/TSYE agar +5% NaCl for 48 h at 37°C . Plates containing less than 300 cfu/mL were selected for counting.

RESULTS AND DISCUSSION

Results of the experiment showed that inactivation and injury of *E. coli* and *L. innocua* cells in beetroot juice, subjected to HHP, depended on origin of strain and parameters of process. Survival of population for studied conditions for all media are presented in Figures from 1 to 4.

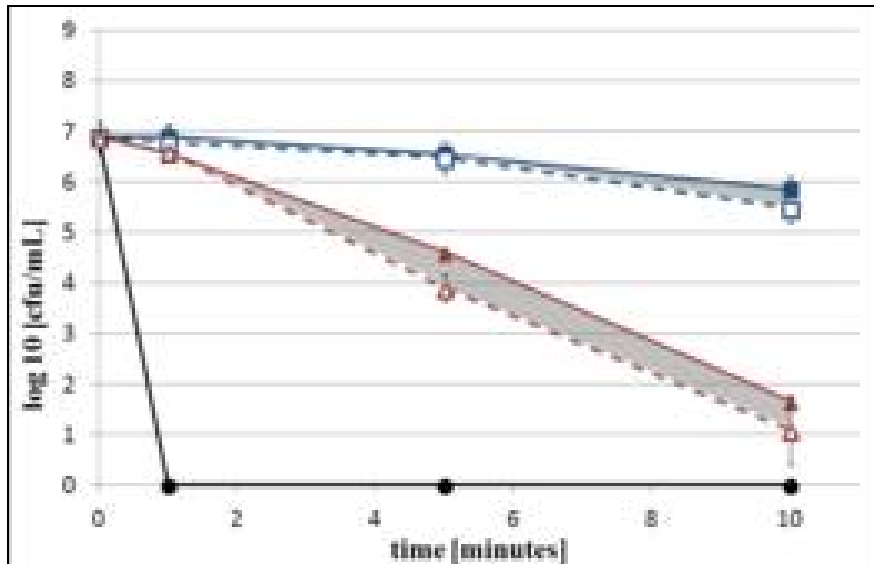


Figure 1. Effect of high hydrostatic pressure on the survival and sublethal injury of *L. innocua* CIP80.11T in beetroot juice. The level of all surviving cells (injured and uninjured) subjected to 200 MPa (■), 300 MPa (▲) and 400 MPa (●). The level of uninjured cells in population subjected to 200 MPa (□), 300 MPa (□) and 400 MPa (○).

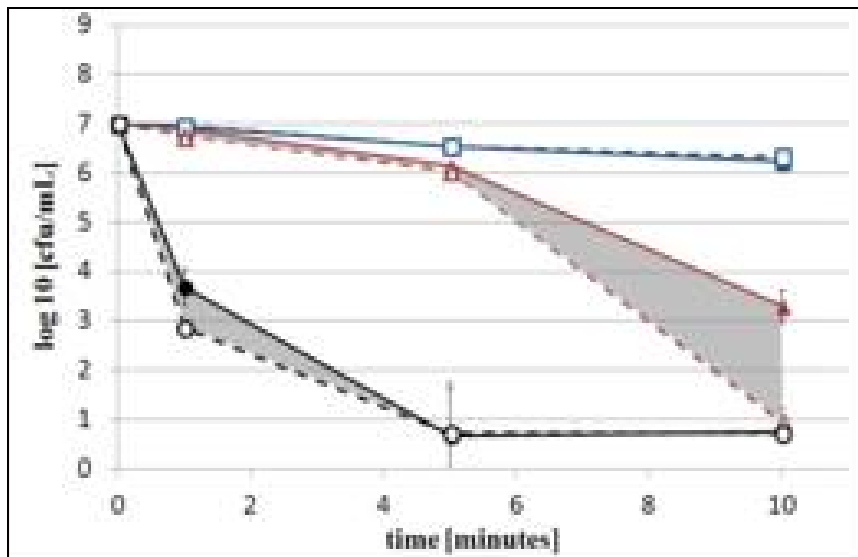


Figure 2. Effect of high hydrostatic pressure on the survival and sublethal injury of *L. innocua* wild type strain in beetroot juice. The level of all surviving cells (injured and uninjured) subjected to 200 MPa (■), 300 MPa (▲) and 400 MPa (●). The level of uninjured cells in population subjected to 200 MPa (□), 300 MPa (□) and 400 MPa (○).

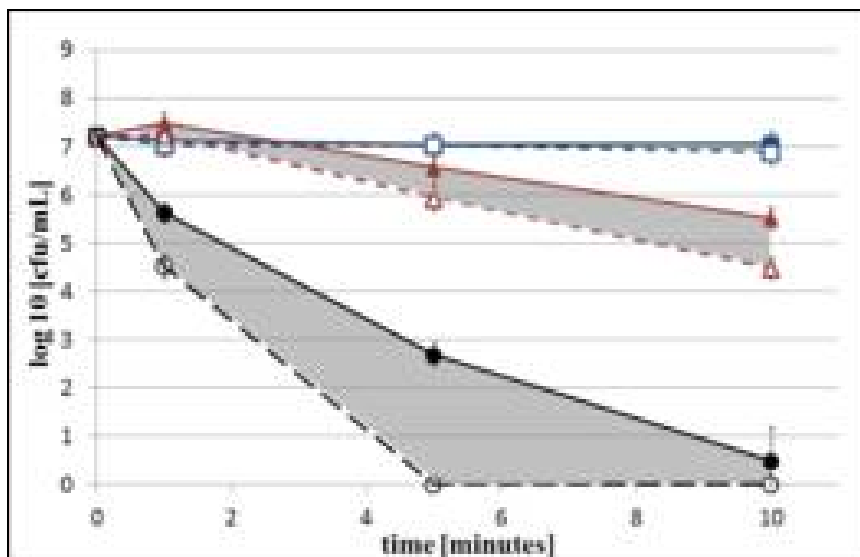


Figure 3. Effect of high hydrostatic pressure on the survival and sublethal injury of *E. coli* ATCC 8739 in beetroot juice. The level of all surviving cells (injured and uninjured) subjected to 200 MPa (■), 300 MPa (▲) and 400 MPa (●). The level of uninjured cells in population subjected to 200 MPa (□), 300 MPa (□) and 400 MPa (○).

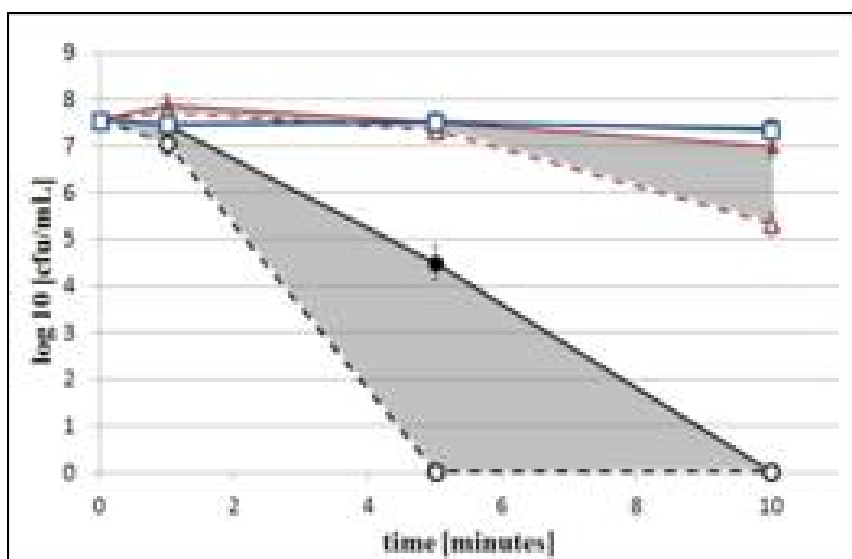


Figure 4. Effect of high hydrostatic pressure on the survival and sublethal injury of *E. coli* wild type strain in beetroot juice. The level of all surviving cells (injured and uninjured) subjected to 200 MPa (■), 300 MPa (▲) and 400 MPa (●). The level of uninjured cells in population subjected to 200 MPa (□), 300 MPa (□) and 400 MPa (○).

No pronounced effect on reduction of number of pathogens was observed after HHP treatment at 200 MPa. Similar observation was reported by Jordan et al [2001] in earlier studies carried out on orange (pH 3.8) and tomato juice (pH 4.1) for *L. monocytogenes* NCTC11994 under 200 MPa at 20°C for 5 min, although inactivation in apple juice (pH 3.5) was more successful and achieved 4.0 log₁₀. The differences of inactivation between collection and wild type strains of the same species were observed under 300 MPa. For *L. innocua* after 5 min treatment collection strain demonstrated 2.3 log₁₀ reduction, while under the same conditions the reduction for wild type strain was 0.9 log₁₀. For *E. coli* after 10 min treatment collection strain demonstrated 1.7 log reduction while under the same conditions the reduction for wild type strain was only 0.6 log.

Lethal effect was reported after treatment at 400 MPa for the most of strains. For the collection strain of *L. innocua* it was reported after 1 minute of HHP. In the case of wild type strain under the same condition reduction was 3.3 log₁₀. Increasing time of exposure up to 10 minutes resulted in the decrease of the number of population of wild type strain under 1 log₁₀ but did not provide complete injury. The wild type strain of *E. coli* was inactivated after 10 min HHP treatment, but for the collection strain there was no complete injury even at the most severe conditions used.

The maximum level of sublethal injuries was reported under pressure 300 MPa for *L. innocua* and reached 0.7 and 2.3 log₁₀ for collection strain (after 10 minutes) and wild type (after 5 minutes), respectively. Exposure to 400 MPa for 5 minutes allowed to reach 2.7 and 4.5 log₁₀ sublethal injuries for collection strain and wild type respectively.

CONCLUSION

Our study confirmed that HHP is a good method for beetroot juice preservation and ensures consumer safety. Collection strains of both pathogens were easier to inactivate in beetroot juice than the strains isolated from natural environment.

REFERENCES

1. Bayindirli A., Alpas H., Bozoglu F., Hizal M. (2006). Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices. *Food Control.*, 17, 52–58
2. Buzrul S., Alpas H., Largeteau A., Demazeau G. (2008). Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in kiwifruit and pineapple juices by high hydrostatic pressure. *Int. J. of Food Microb.*, 124, 275–78

3. Goulet V., Hedberg C., A. Le Monnier, and H. de Valk. (2008). Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerg. Infect. Dis.*, 14, 734–740
4. Hoover D.G., Metrick C., Papineau A. M., Farkas D. F., Knorr D. (1989). Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technol.*, 43 (3), 99–107
5. Mackey, B.M. (2000). Injured bacteria, in M. Lund, T. C. Baird – Parker and G. W. Gould (ed.) *The microbial safety and quality of food*, Aspen Publisher, Inc., Gaithersburg, MD
6. Marszałek K., Mitek M., Skąpska S. (2014). The effect of thermal pasteurization and high pressure processing at cold and mild temperatures on the chemical composition, microbial and enzyme activity in strawberry purée. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2014.10.009>
7. Sapers G. M. (2003). Washing and sanitizing raw materials for minimally processed fruit and vegetable products, in: *Microbial safety of minimally processed foods*. Novak J. S., Sapers G. M. Juneja V. K. ((Red.). CRC Press.: 221–253
8. Sokołowska B., Chotkiewicz M., Niezgoda J., Dekowska A. (2011). Ocena zanieczyszczenia mikrobiologicznego świeżych, niepasteryzowanych, wyciskanych soków owocowych i warzywnych dostępnych w handlu. *ZPPNR*, 569, 219–228
9. Sokołowska B., Skąpska S., Fonberg-Broczek A., Niezgoda J., Rutkowska M., Chotkiewicz M., Dekowska A., Dobros N., Rzoska S. J. (2012). Wpływ wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na naturalną mikroflorę i barwę soków z warzyw korzeniowych, *Post. Nauki Technologii Przem. Rol.-Spoż.*, 67 (4), 5–15
10. Wesche A. M., Gurtler J. B., Marks B. P., Ryser E. T. (2009). Stress, sublethal injury, resuscitation and virulence of bacterial foodborne pathogens. *J. of Food Prot.*, 72 (5), 1121–1138
11. Yuste J., Capellas M., Fung D. Y. C., Mor – Mur M. (2004). Inactivation and sublethal injury of foodborne pathogens by high pressure processing: Evaluation with conventional media and thin agar layer method. *Food Res. Int.*, 37, 861–866
12. Żyngiel W., Kolenda J. (2009). Wpływ parametrów utrwalania techniką wysokich ciśnień na jakość i trwałość soków. *Bromat. Chem. Toksykol.*, XLII (3), 408–413
13. Presented at 29th International Conference EFFoST (November 09-12, 2015 – Athens, Greece) as Poster 0098

dr hab. inż. Barbara Sokołowska, prof. IBPRS

Warszawa, dn. 30.06.2023

Zakład Mikrobiologii

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego

im. prof. Wacława Dąbrowskiego - PIB

ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Justyna Nasiłowska, Barbara Sokołowska, Monika Fonberg-Broczek, 2016, **The impact of high hydrostatic pressure on inactivation and sublethal injury of foodborne pathogens in beetroot juice**, PNiTPRS, vol. 71, no. 1, pp. 21–27, mój wkład w powstanie pracy polegał na pełnieniu funkcji promotora pracy doktorskiej, wsparciu merytorycznym oraz współudziale przy planowaniu badań i przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 10%.

Sokołowska

dr Monika Fonberg-Broczek

Warszawa, dn. 02.03.2023

Instytut Wysokich Ciśnień PAN

ul. Sokołowska 29/37, 01-142 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Justyna Nasiłowska, Barbara Sokołowska, Monika Fonberg-Broczek, 2016, **The impact of high hydrostatic pressure on inactivation and sublethal injury of foodborne pathogens in beetroot juice**, PNiTPRS, vol. 71, no. 1, pp. 21–27, mój wkład w powstanie pracy polegał na udostępnieniu aparatury do wykonania doświadczeń związanych z wykorzystaniem wysokiego ciśnienia hydrostatycznego. Mój udział procentowy szacuję na 5%.

M. Fonberg-Broczek

Publikacja 2

Nasiłowska J., Sokołowska B., Fonberg-Broczek M. (2018)

Long-term storage of vegetable juices treated by high hydrostatic pressure:

Assurance of the microbial safety. *BioMed Research International*, 2

Research Article

Long-Term Storage of Vegetable Juices Treated by High Hydrostatic Pressure: Assurance of the Microbial Safety

Justyna Nasiłowska ¹, Barbara Sokołowska,^{1,2} and Monika Fonberg-Broczek²

¹Department of Microbiology, Prof. Waclaw Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology,
36 Rakowiecka Str., 02-532 Warsaw, Poland

²Laboratory of Biological Materials, Institute of High Pressure Physics Polish Academy of Sciences,
29/37 Sokołowska Str., 01-142 Warsaw, Poland

Correspondence should be addressed to Justyna Nasiłowska; nasilowska@ibprs.pl

Received 3 August 2018; Revised 30 October 2018; Accepted 29 November 2018; Published 12 December 2018

Guest Editor: María de Guía Córdoba

Copyright © 2018 Justyna Nasiłowska et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Food business operators search for new, mild technologies, which extend the shelf life of product without changing the sensory and nutritional properties. High hydrostatic pressure (HHP) meets these requirements; however it also triggers sublethal injury of bacterial cells. Sublethal injuries could spoil the product during storage and potentially pose major public health concerns. This study aims to examine the changes of sublethally injured pathogens cells in two vegetable juices: carrot juice (pH 6.0-6.7) and beetroot juice (pH 4.0-4.2) that are induced by HHP (300-500 MPa). The possibilities of recovery of bacterial cells during 28 days of juices storage at two different temperatures (5°C and 25°C) were determined using plate count methods. During the entire period of storage of carrot juice at refrigerated temperature, the propagation and regeneration of *L. innocua* strains were observed. Storage at 25°C showed that the number of these bacteria drastically decreased between 14 and 21 days. The above phenomenon was not detected in *E. coli* case. There was no cells recovery during long-term refrigerated storage for all strains in beetroot juice. However, in some cases spoiling of this product intermittently occurred at 25°C storage temperature. This work demonstrates that carrot juice supports growth and regeneration of HHP-sublethally injured *L. innocua*, while beetroot juice can be classified as a safe product.

1. Introduction

Vegetable juices belong to the group of functional food and play an important role in human's diet. Some reviews of the previous studies indicated that they could help prevent several major civilization diseases, such as heart problems, cancer, diabetes, and obesity, as well as the prevention and alleviation of several micronutrients deficiencies [1–3]. In view of its health-related properties, they have attracted great interest among consumers. Both carrot (*Daucus carota*) and red beet (*Beta vulgaris*) are traditional and popular vegetables in many parts of the world. They contain natural antioxidants, high amount of vitamins, minerals, and trace elements [4–8]. However, raw vegetable juices have limited market potential, due to its short shelf life, and should normally be consumed within a few days [9]. Moreover, vegetable juices are the most contaminated among the commercially available raw juices

[10, 11]. The initial microbial load is typically approximately 6.0 log CFU/mL [11, 12], including pathogens [11, 13]. One of the reasons of vegetable juice contamination with potentially hazardous microorganisms is natural fertilizers that are often applied in ecological agricultures [14]. Pathogenic bacteria survive in soil for a relatively long period of time, depending on environmental conditions. It is significant that the low-acid condition of raw, unprocessed vegetable juices is conducive to the growth of pathogenic microorganisms, such as *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, or *Campylobacter jejuni* [11, 13–17]. Wherefore, some manufacturers lower pH of vegetable juices using ascorbic acid or addition of apple juice to extend the shelf life and provide safety of the fresh juice. Despite these efforts, the most often detected pathogens in unpasteurized fresh beetroot and carrot juices are *Listeria* species and coliforms [11, 18].

High hydrostatic pressure (HHP) has been officially approved by The U.S. Food and Drug Administration, as a nonthermal pasteurisation technology [19]. Nowadays, HHP has attracted widespread attention of food industry members and is the most successfully commercialized nonthermal processing technology [19, 20]. This technology enables better quality of food to be obtained, rather than that processed using traditional methods. Primarily, it not notably changes the sensory and nutritional attributes of product but reduces the microbial counts responsible for spoilage and for shortening the shelf life [21–26]. Despite the above benefits, HHP triggers sublethal injury of bacterial cells [27–31].

Generally, HHP induces varying levels of sublethal injury. High pressure changes cell morphology and genetic mechanism and inhibits the metabolic reactions, which are essential for the cell maintenance [26]. Magnitude of these phenomena may be different depending on the genus or even species of microorganism, type of substrate, and processing parameters. Different food preservation strategies bring different stress factors that affect the microbiota of product. Scientific research has yielded some important information on the factors, affecting the injuries and recoveries of bacterial cells in food matrices [32, 33]. Nowadays, it is apparent that both phenomena depend on type of technology, as well as environmental conditions such as food pH, storage temperature, addition of various components on the food including nutrients, preservatives, etc. The regulatory network allows the stressed bacteria to react on changes by activating the proper mechanism, which allows them to adapt [33]. Sublethally injured cells may exist in the population, although most microbes are killed. Moreover, food matrices can be bacteriostatic as well as bactericidal, due to intrinsic factors including water activity, pH, salt content, etc. The injured cells can develop adaptive responses to stress, resuscitate in a medium containing the necessary nutrients, and grow during storage. On the other hand, the injured cells may develop sensitivity to physical and chemical environments, to which normal cells are resistant [33] and lose the ability to grow on defined culture media. The presence of sublethally injured cells in food poses major public health concerns and is crucial in assessing the microbial response to food preservation strategies [34]. On the other hand, only a small portion of merchant suppliers offer HHP-treated vegetable juices [25]. Moreover, no high pressure food is currently available under room temperature on the market [20, 26].

According to European Commission Regulation (EC) No. 2073/2005 [35] manufacturers are obliged to ensure microbial safety of food products up to the end of the declared shelf life. Apart from microbiological criteria for foodstuffs, above document specifies the methods to demonstrate the possibilities of propagation of microorganisms during the shelf life of the product. One of these tools is the microbiological challenge testing. Challenge testing is a practical study that evaluates the behaviour of crucial organisms (e.g., pathogens), which display opportunity of grow and/or survive in the food matrices and if so, how fast they will grow. Examined food product is contaminated by relevant microorganisms and

then stored and tested for these organisms during shelf life [36, 37], which is used for estimation of the growth potential (δ).

The aim of this study was to evaluate the survival rate and the regeneration possibilities of HHP-sublethally injured bacterial cells in two types of vegetable juices during long-term storage at two different temperatures. In addition to this, the understanding of the behaviour of HHP-sublethally injured cells during storage may be helpful to design and control the process, as well as establish the hold time limits for storage.

2. Materials and Methods

2.1. Microorganisms and Growth Conditions. *E. coli* ATCC 7839 (obtained from American Typed Culture Collection, Manassas, USA) and *L. innocua* CIP80.11T (obtained from the Culture Collection of the Institut Pasteur, Paris, France) wild strains, which were isolated from unpasteurized, commercial beetroot juice, *L. innocua* 23/13 and *E. coli* 61/14, obtained from the Department's collection of Fruit and Vegetable Product Technology at IAFB (Warsaw, Poland), were used in this investigation. The strains were stored in a Cryobank at a temperature below $-27 \pm 3^\circ\text{C}$ before using. First, pure culture immobilized on sterile beads was added to 10 ml of sterile Brain Heart Infusion (BHI) broth (BioMerieux, l'Etoile, France). Broth subcultures were incubated at 37°C for 24 h, then each overnight culture was moved with a $10 \mu\text{L}$ loop on a Petri dish, with the usage of streak plate technique with Tryptic Soy (TSA) agar (Biocar Diagnostics, Beauvais, France) for *E. coli* or Tryptic Soy Yeast Extract (TSYE) agar (Biocar Diagnostics, Beauvais, France) for *L. innocua*. Next, the culture from the plate was added, using $10 \mu\text{L}$ loop, to 250 mL Erlenmeyer flasks containing 200 mL of Tryptic Soy Broth (TSB) (Biocar Diagnostics, Beauvais, France), or Tryptic Soy Broth with Yeast Extract (TSBYE) (Biocar Diagnostics, Beauvais, France) in order, that prepare the second subculture, which was incubated at 37°C for 18 h to obtain the stationary phase culture. Then 10 mL of second subculture was added to fresh, sterile broth (TSB or TSYEB) and incubated at 37°C for 18 h. The cultures were then harvested by centrifugation ($4000 \times g$, 10 min., 4°C). The sedimented cells were aseptically resuspended into phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and again centrifuged. The washing procedure was repeated twice more. Following this, the model of bacterial cells suspensions was prepared in PBS. Just before HHP treatment, pasteurized beetroot juice supplemented with 5% apple juice (Victoria Cymes, pH 4.0-4.2) and carrot juice (Vital Fresh, pH 6.0-6.7) were inoculated with bacterial suspensions, in an amount of about $7.0 \log \text{CFU/mL}$, determined by spread plating appropriate dilutions on to TSA/TSYEA, and transferred into sterile polyethylene tubes (Sarstedt, Newton, USA) in 13 mL portions in duplicate.

2.2. HHP Equipment. The samples were exposed to high pressure treatment, with the use of U 4000/65 apparatus (Unipress, Warsaw, Poland). The volume of the treatment chamber was 0.95 L, and the maximum working pressure

TABLE 1: High hydrostatic pressure conditions.

Strains	HHP parameters	
	beetroot juice	carrot juice
	pressure/time	
<i>Listeria innocua</i> CIP 80.11T	300 MPa/ 5 minutes	400 MPa/ 5 minutes
<i>Listeria innocua</i> -wild type strain 23/13	300 MPa/ 10 minutes	400 MPa/ 5 minutes
<i>Escherichia coli</i> ATCC 7839	300 MPa/ 10 minutes	500 MPa/ 5 minutes
<i>Escherichia coli</i> -wild type strain 61/14	300 MPa/ 10 minutes	500 MPa/ 5 minutes

was 600 MPa. The pressure-transmitting fluid, that was used, was distilled water and polypropylene glycol (1:1, v/v). The working temperatures of the apparatus range from -10°C to $+80^{\circ}\text{C}$. Pressure of up to 400 MPa was generated in 70-80 s, and the release time was 2-4 s. Samples were subjected to high hydrostatic pressure at various pressure, depending on the strain and juice (300, 400, 500 MPa), at an ambient temperature (i.e., approximately 20°C) and held for 5 or 10 min (Table 1). The use of different pressure parameters was aimed at induction of the highest level of sublethal bacterial injuries in the sample. These process conditions trigger the highest level of sublethal injury of these cell strains and were chosen based on our earlier studies [38, 39]. Temperature increase, due to the adiabatic heating, was approximately 3°C per 400 MPa. The pressurization times reported do not include the come-up and come-down time. For each tested strain, juice, and storage temperature, the assays were performed with usage of the two independent samples, which were coming from the two independent processes. After the treatment, the samples were stored at 5°C and 25°C up to 28 days and periodically analyzed. Unpressurized samples were used as a control.

2.3. Plate Count Analytical Methods. The viability of each strain was assayed by counting colony-forming units immediately after HHP processing. Thereafter, both treated and untreated juices were enumerated at regular intervals during refrigerated storage. At each sampling time, a tube with the sample was opened aseptically and analyzed. Further decimal dilutions in Tryptone Salt Broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), of each sample, were prepared. Appropriate dilutions of samples were spread on agars. Counts of total viable cells were determined by spread plate on TSA or TSYEA. Selective agars, that were agars supplemented with critical NaCl (POCh, Gliwice, Poland) concentration of 5% (w/v), were used to determine noninjured cells in the population. That was the maximum concentration of NaCl that caused no reduction in the colony count of unstressed cells, estimated in the preliminary trial. The number of sublethally injured survivors was quantified by the difference, between the viable and noninjured cells. Plates with nonselective agars were incubated for 24 h/ 37°C and selective agars for 48 h/ 37°C . The plates containing less than 300 CFU/mL were selected for counting.

2.4. Statistical Analysis. Statistical analysis of the results was performed by two-way ANOVA statistical model with

Tukey's test, using Statistica version 13 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA). The differences were considered significant at $p < 0.05$. Statistical comparison was made for results, obtained for strains of the same species at the same temperature and matrix.

3. Results and Discussion

3.1. Effect of Storage Temperature on *E. coli* and *L. innocua* in Vegetable Juices. In the present study, two types of high pressure treated-vegetable juices (beetroot and carrot) were analyzed during four weeks of storage time to test their microbiological safety. We tested if sublethally injured by HHP bacterial cells would be able to regenerate and survive in those vegetable juices. The second goal was to investigate if storage at ambient temperature would support the growth of HHP-treated bacteria in comparison to refrigerated conditions. As a preliminary experiment, we studied the effect of HHP on tested species, in both, previously mentioned types of juices in a range of pressure 200-500 MPa up to 10 minutes. The next step that was done was the screening analysis to choose the parameters, which induce the highest level of sublethal injury of those bacterial strains. The results showed that in carrot juice pressure of 400 MPa for 5 minutes triggers sublethal injuries of *Listeria innocua* strains, while extending the parameters inactivates these bacteria. In turn, *Escherichia coli* strains were sublethally injured under pressure of 500 MPa for 5 minutes [data not shown]. Induction of sublethal injuries of those bacterial cells in beetroot juice needed milder parameters: 300 MPa up to 10 minutes [38, 39]. Because of the aforementioned, this experiment shows the results carried out only with the use of those parameters, which prompted the highest level of sublethal injuries (Table 1).

The survivability of strains, in untreated juice samples, is shown in Figure 1. Despite the acid pH of beetroot juice, significant decrease of population for all the tested strains was not observed during storage at both temperatures ($p \geq 0.05$). Number of viable cells, of tested strains in beetroot juice at both temperatures, decreased by less than 1.0 log CFU/mL during all period of storage. Exclusively, number of *L. innocua* wild type strain in beetroot juice, stored at 25°C , reduced about 2.1 log CFU/mL. In carrot juice, stored at 5°C number of viable cells of tested strains was between 7 and 10 log CFU/mL. During the entire period of storage, the viability of *E. coli* was stable, while the propagation of *L. innocua* was observed. Number of *L. innocua* in population had increased

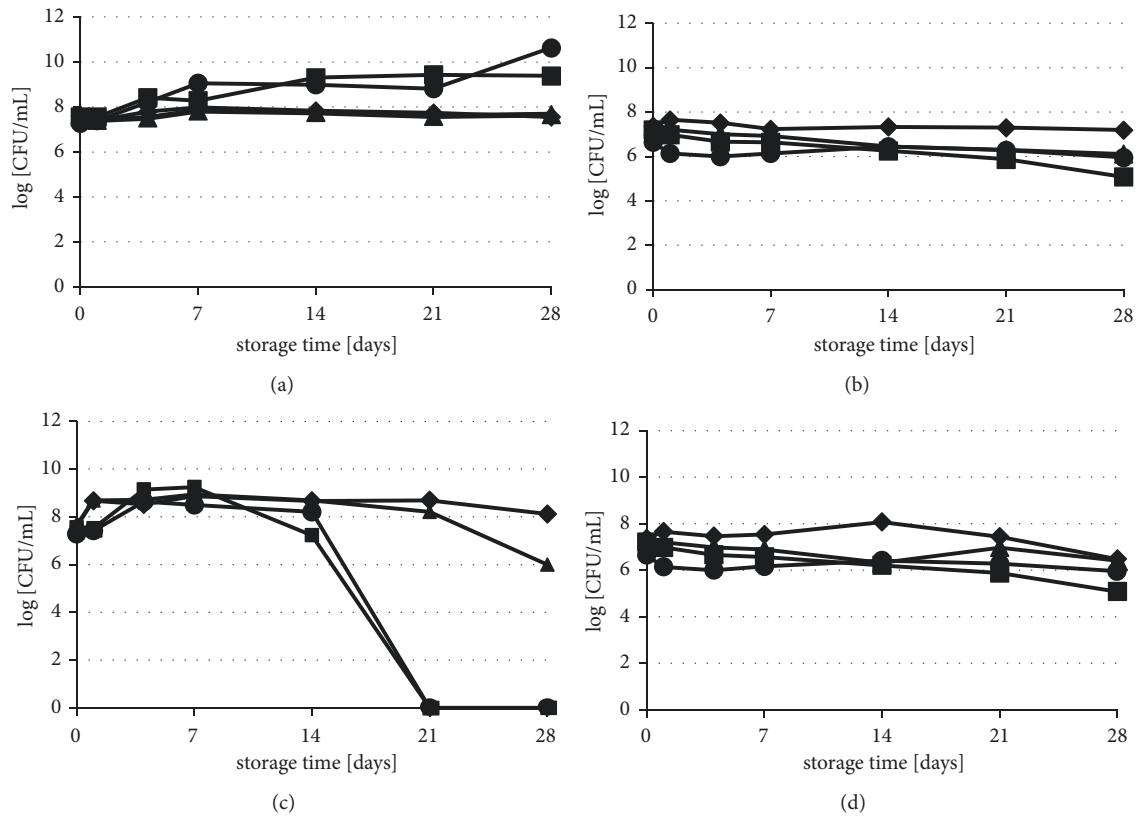


FIGURE 1: Survival of *L. innocua* strains: (●) CIP80.11T, (■) 23/13 and *E. coli* strains, (▲) ATCC 7839IP80.11T, and (◆) 61/14 in untreated juice samples: (a) carrot juice stored at 5°C, (b) beetroot juice stored at 5°C, (c) carrot juice stored at 25°C, and (d) beetroot juice stored at 25°C, for up to 28 days.

by 1.8 and 3.3 log depending on the strain. In turn, results obtained at 25°C had shown that amount of viable *E. coli* cells increased about 1.0 log CFU/mL, while significant differences were found for *L. innocua*. Survival rates of both *L. innocua* strains correlated negatively with temperature. The number of these bacteria drastically decreased, between 14 and 21 days of storage, at 25°C. Monitoring of carrot juice pH (suspended with *L. innocua* strains) showed that this parameter decreased from 6.2 to 4.2 during 28 days of storage, while pH of carrot juice without bacteria was found stable for all time of storage (6.18 ± 0.04).

Patterson *et al.* (2012) have suggested that carrot juice is inherently detrimental to the growth of *L. monocytogenes*. They observed survivability of pathogenic bacteria in two variants of carrot juice control samples, during 10 days of storage at 4°C, 8°C, and 12°C. Both, heat and nonheat sterilized, carrot juice control samples were inoculated by cocktail of *L. monocytogenes* and then stored. Number of *L. monocytogenes*, suspended in nonheat carrot juice, decreased at refrigerated temperatures by 6.56 log CFU/mL to 5.06 log CFU/mL and 6.00 log CFU/mL, respectively. In case of prior heat sterilized carrot juice, *Listeria* numbers increased during storage at all temperatures. Presumably, these differences are associated with thermal-sensitive properties of antimicrobial compounds in carrot juice (carrot juice of our

studies was pasteurized). Additionally, authors had searched for influence of carrot juice properties on *E. coli*. Their results were similar to our findings. They observed that the number of *E. coli* in carrot juice remained constant, while juice was stored up to 14 days at 4°C; however it increased during storage at 8°C and 12°C. Moreover, heat treating of carrot juice prior to inoculation had no effect on growth on *E. coli*. The same results were achieved by Gómez Aldapa *et al.* (2013). It has been reported that the growth of the cocktail of diarrheagenic *E. coli* pathotype in carrot juice was inhibited at refrigerated temperature. After 24 h number of all diarrheagenic *E. coli* pathotypes increased during storage at 12°C, 20°C, 30°C, and 37°C. Some researchers had been trying to answer, how long pathogens would survive in acid juices if a contamination occurred [40–42]. *Escherichia coli* O157:H7 survived in pineapple juice (pH 3.57) for 120 days in refrigerated temperature, but during ambient temperature storage, some decline in count was noted. In turn, avocado juice (pH 6.2) supported growth of these bacteria at both temperatures [40]. Significant number of *Listeria monocytogenes* suspended in tomato juice survived during storage at 5°C and 30°C for 12 days; however counts of those bacteria slightly decreased in refrigerated temperature [41]. Oyarzábal *et al.* (2003) showed that *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* were recoverable through 12

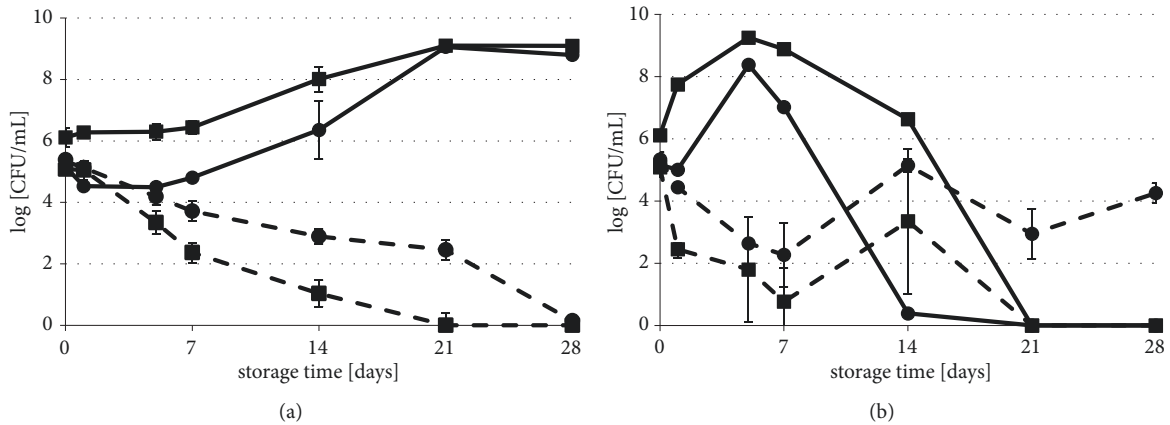


FIGURE 2: Survival of *L. innocua* strains in HHP treated carrot (—) and beetroot juice (----) stored at 5°C (a) and 25°C (b) for up to 28 days. *L. innocua* (●) CIP80.11T and (■) *L. innocua* 23/13. HHP sublethal treatment conditions for each strain are in Table 1. The error bars represent the standard deviation of measurements for 2 samples in two separate sample runs. Limit of detection was 1 log CFU/mL.

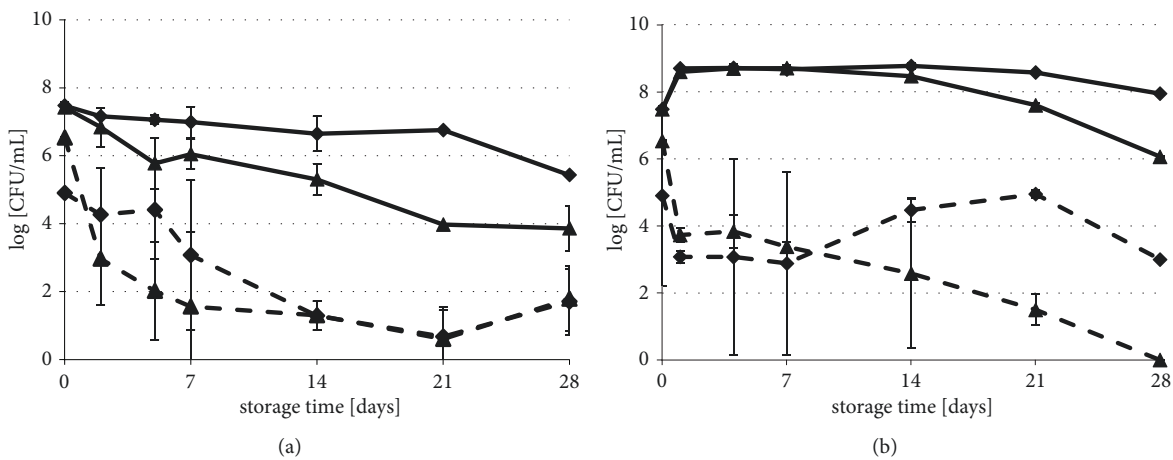


FIGURE 3: Survival of *E. coli* strains in HHP treated carrot (—) and beetroot juice (----) stored at 5°C (a) and 25°C (b) for up to 28 days. *E. coli* ATCC 7839IP80.11T (▲) and *E. coli* 61/14 (◆). HHP sublethal treatment conditions for each strain are in Table 1. The error bars represent the standard deviation of measurements for 2 samples in two separate sample runs. Limit of detection was 1 log CFU/mL.

weeks of storage at -23°C in apple, orange, pineapple, and white grape juice concentrates (pH 3.6-3.7) and banana puree (pH 5.5).

3.2. Effect of Long-Term Storage and Temperature on Survival and Regeneration of HHP-Sublethally Injured *E. coli* and *L. innocua* in Vegetable Juices. The impact of long-term storage on the survival of HHP-injured bacterial strains, in carrot and beetroot juices, is shown in Figures 2 and 3. Survival rates of *L. innocua* in carrot juice during 4-week refrigerated storage were similar to both collection and wild type strain (Figure 2(a)). It was observed that the number of the bacterial population significantly increased, by 3.64 log CFU/ml and 2.98 log CFU/ml, respectively, in reference to initial HHP-treated viable cell counts. In beetroot juice, the reduction of the *L. innocua* cells in the population was noticed (Figure 2(a)). On the 21st day of storage, cells of the wild type strain were not detected. A week later, the collection

strain was also below the detection level (1.0 log CFU/mL). *E. coli* growth during long-term refrigerated storage was not observed, neither in carrot juice nor in beetroot juice (Figure 3(a)). However, the progress of the cell reduction in the population was noticeably faster in beetroot juice during 4-week refrigerated storage. The number of the *E. coli* cells of collection and wild type strain in populations decreased. In the case of carrot juice, the decrease was 3.57 and 2.05 log CFU/ml. When it comes to beetroot juice, the decrease was 5.42 and 3.19 log CFU/ml, in reference to initial microbial counts, just after HHP treatment. The *E. coli* population in beetroot juice accomplished nearly 1.0 log CFU/mL after 21 days of refrigerated storage. However, extending the storage time to 4 weeks showed microbial growth of these bacteria.

The number of *L. innocua* in the population increased by over 3.0 log CFU/mL during the 4 days of storage of carrot juice at 25°C (Figure 2(b)). The subsequent storage resulted in the rapid decrease of the amount of these bacteria in samples. After the 3-week period, the growth was not

TABLE 2: Results of the growth potential.

Type of sample		Time [days of storage]	log CFU/mL	growth potential (δ)
Carrot juice stored at 5°C	<i>Listeria innocua</i>	T=0	5,16	3,65
	CIP 80.11T	T=28	8,82	
	<i>Listeria innocua</i> -wild type	T=0	6,12	2,98
	strain 23/13	T=28	9,10	
	<i>Escherichia coli</i>	T=0	7,42	-3,56
	ATCC 7839	T=28	3,86	
	<i>Escherichia coli</i> -wild type strain 61/14	T=0	7,48	-2,05
		T=28	5,43	
Beetroot juice stored at 5°C	<i>Listeria innocua</i>	T=0	5,37	-5,37
	CIP 80.11T	T=28	0,00	
	<i>Listeria innocua</i> -wild type	T=0	5,15	-5,15
	strain 23/13	T=28	0,00	
	<i>Escherichia coli</i>	T=0	6,53	-4,35
	ATCC 7839	T=28	2,18	
	<i>Escherichia coli</i> -wild type strain 61/14	T=0	6,50	-3,38
		T=28	3,11	
Carrot juice stored at 25°C	<i>Listeria innocua</i>	T=0	5,16	-5,16
	CIP 80.11T	T=28	0,00	
	<i>Listeria innocua</i> -wild type	T=0	6,12	-6,12
	strain 23/13	T=28	0,00	
	<i>Escherichia coli</i>	T=0	7,48	-1,42
	ATCC 7839	T=28	6,06	
	<i>Escherichia coli</i> -wild type strain 61/14	T=0	7,48	0,46
		T=28	7,94	
Beetroot juice stored at 5°C	<i>Listeria innocua</i>	T=0	5,37	-1,06
	CIP 80.11T	T=28	4,31	
	<i>Listeria innocua</i> -wild type	T=0	5,15	-5,15
	strain 23/13	T=28	0,00	
	<i>Escherichia coli</i>	T=0	6,53	-6,53
	ATCC 7839	T=28	0,00	
	<i>Escherichia coli</i> -wild type strain 61/14	T=0	6,50	-3,50
		T=28	3,00	

The growth potential (δ) is the difference between the log at the end of shelf life and the log of the initial concentration.

Criteria:

$\delta > 0.5$ log CFU/mL, growth of bacteria possible.

$\delta \leq 0.5$ log CFU/mL, growth of bacteria impossible.

observed. Growth of *E. coli* was noticed, only in the first 48th h of storage at 25°C (Figure 3(b)). During the next 12 days of storage, survival of *E. coli* strains in HHP, carrot juice was found stable and reached about 9 log CFU/mL. However, after that time, the population of the wild type strain slightly decreased by 2.40 log CFU/mL (Figure 3(b)). The number of *L. innocua* cells in the population decreased after 7 days of beetroot juice storage at 25°C (Figure 2(b)). Extension of the storage time caused unitary spoilage of this product. On the last day of storage, the number of *L. innocua* collection strain cells reached to 4.26 log CFU/mL, while the number of wild type strains was under the detection limit. The opposite phenomenon was observed with *E. coli* (Figure 3(b)). The number of collection strains in HHP-beetroot juice was

under 1.0 log CFU/mL, at the end of the period of storage at 25°C. During the same storage conditions, *E. coli* wild type strain increased and reached 3.0 log CFU/mL on the 28th day. The results of the growth potential (δ) are shown in Table 2. Only in the case of *L. innocua* strains in carrot juice, stored at 5°C, the growth potential was above 0.5 log CFU/mL. This result means that the carrot juice supported growth of *L. innocua*, which was stored at refrigerated conditions. In other juice samples, the value of bacterial growth potential was less than the critical value. Hence, these conditions retard the propagation of tested strains.

The changes of sublethal injuries of bacterial cells in vegetable juices, during long-term storage at 5°C and 25°C, are shown in Tables 3 and 4, respectively. Initial levels

TABLE 3: Changes of sublethal injuries of bacterial strains during juices long-term storage at 5 °C.

Type of juice Strains/storage time [days]	Sublethal injuries in beetroot juice [log CFU/ml]						Sublethal injuries in carrot juice [log CFU/ml]						
	0 d	1 d	4 d	7 d	14 d	28 d	0 d	1 d	4 d	7 d	14 d	21 d	28 d
<i>Listeria innocua</i> CIP 80.11T	2.95 ± 0.32 ^{ab}	3.13 ± 0.07 ^{ab}	2.51 ± 0.19 ^{abc}	2.13 ± 0.08 ^{bcd}	2.59 ± 0.11 ^{abc}	Nd ^e	3.15 ± 0.99 ^a	1.52 ± 0.16 ^b	0.22 ± 0.10 ^c	0.48 ± 0.26 ^{bc}	0.07 ± 0.01 ^f	0.02 ± 0.03 ^c	-0.02 ± 0.02 ^c
<i>Listeria innocua</i> -wild type strain 23/13	3.22 ± 0.22 ^{ab}	3.56 ± 0.63 ^a	2.59 ± 0.61 ^{abc}	1.56 ± 0.24 ^{cd}	0.89 ± 0.41 ^{de}	Nd ^e	4.46 ± 0.37 ^a	1.04 ± 0.29 ^{bc}	0.19 ± 0.17 ^c	0.26 ± 0.01 ^c	0.02 ± 0.02	0.08 ± 0.01 ^c	0.00 ± 0.00 ^c
<i>Escherichia coli</i> ATCC 7839	4.53 ± 0.04 ^a	1.73 ± 0.38 ^b	0.98 ± 0.03 ^{bc}	0.86 ± 0.23 ^{bc}	0.83 ± 0.25 ^{bc}	0.18 ± 0.25 ^a	4.66 ± 0.63 ^a	4.18 ± 0.01 ^{ab}	2.96 ± 0.24 ^{cde}	1.69 ± 0.15 ^{def}	1.83 ± 0.09 ^{def}	1.97 ± 0.03 ^{def}	1.49 ± 0.18 ^f
<i>Escherichia coli</i> -wild type strain 61/14	2.90 ± 0.56 ^{ab}	3.63 ± 0.46 ^a	4.41 ± 0.25 ^a	2.68 ± 0.97 ^a	1.13 ± 0.60 ^b	0.52 ± 0.31 ^a	2.98 ± 0.02 ^{bd}	3.46 ± 0.02 ^{bc}	3.04 ± 0.23 ^{bd}	1.11 ± 0.76 ^{ef}	2.01 ± 0.12 ^{def}	2.67 ± 0.57 ^{cde}	5.43 ± 0.14 ^a

All data were the mean ± SD, n=2.

a-f: values in rows denoted with the same letter are significantly different ($p < 0.05$).

Nd: not detected.

TABLE 4: Changes of sublethal injuries of bacterial strains during juices long-term storage at 25°C.

Type of juice Strains/storage time [days]	Sublethal injuries in beetroot juice [log CFU/ml]							Sublethal injuries in carrot juice [log CFU/ml]						
	0 d	1 d	4 d	7 d	14 d	21 d	28 d	0 d	1 d	4 d	7 d	14 d	21 d	28 d
<i>Listeria innocua</i> CIP 80.11T	2.95 ± 0.32 ^a	1.75 ± 0.19 ^{ab}	1.12 ± 0.91 ^{bc}	0.35 ± 0.49 ^{bc}	0.00 ± 0.00 ^c	2.95 ± 0.08 ^a	0.05 ± 0.10 ^{bc}	3.15 ± 0.99 ^a	0.11 ± 0.14 ^b	0.48 ± 0.70 ^b	0.10 ± 0.09 ^b	0.39 ± 0.55 ^b	Nd ^b	Nd ^b
<i>Listeria innocua</i> -wild type strain 23/13	3.22 ± 0.22 ^a	0.41 ± 0.27 ^{bc}	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c	0.55 ± 0.78 ^{bc}	Nd ^c	Nd ^c	4.46 ± 0.37 ^a	0.06 ± 0.08 ^b	0.08 ± 0.08 ^b	0.08 ± 0.06 ^b	0.69 ± 0.78 ^b	Nd ^b	Nd ^b
<i>Escherichia coli</i> ATCC 7839	4.53 ± 0.04 ^a	0.58 ± 0.21 ^{ab}	2.41 ± 1.08 ^{ab}	1.18 ± 0.10 ^{ab}	2.58 ± 2.24 ^{ab}	1.50 ± 0.45 ^{ab}	0.00 ± 0.95 ^b	4.66 ± 0.58 ^a	1.12 ± 0.04 ^d	0.00 ± 0.00 ^f	0.27 ± 0.02 ^{def}	0.68 ± 0.10 ^{def}	2.60 ± 0.05 ^c	3.60 ± 0.45 ^b
<i>Escherichia coli</i> -wild type strain 61/14	2.90 ± 0.56 ^{ab}	0.42 ± 0.11 ^b	1.07 ± 0.10 ^{ab}	1.15 ± 0.27 ^{ab}	0.67 ± 0.32 ^{ab}	0.64 ± 0.25 ^{ab}	1.00 ± 0.00 ^{ab}	2.98 ± 0.02 ^{bc}	0.42 ± 0.02 ^{def}	0.27 ± 0.07 ^{def}	0.42 ± 0.07 ^{def}	0.45 ± 0.02 ^{def}	1.02 ± 0.09 ^{de}	2.63 ± 0.42 ^c

All data were the mean ± SD, n=2.

a-f: values in rows denoted with the same letter are significantly different ($p < 0.05$).

Nd: not detected.

of sublethal injury of the strains, after HHP treatment, were 2.9-4.5 log CFU/ml. The regeneration of sublethally injured cells suspended in carrot juice was observed. The regeneration of *L. innocua* after the first day of storage at 5°C (Table 3) and at 25°C (Table 4) was significant. The number of injured cells of *E. coli* collection strain significantly decreased ($p < 0.05$), up to the 7th day of refrigerated storage. Thereafter, some differences in the number of sublethally injured cells were found, although they were not statistically significant ($p \geq 0.05$). Up to the first 7 days of storage, the regeneration of sublethally injured cells of wild type *E. coli* was also observed. Extending the storage time resulted in the gradual increase in the number of injured cells of wild type *E. coli*. At the 28th day of storage, the level of injured cells reached about doubled (5.43 log CFU/mL). Decreasing tendency of sublethal injury of *E. coli*, during storage of the HHP-carrot juice at 25°C, was also observed. This phenomenon was much faster, than at 5°C (Table 4). After 24 hours of storage, the number of regenerated cells of collection strain was 0.48 log CFU/mL at 5°C and 3.54 log CFU/mL at 25°C. In most instances, there was no significant cells recovery, during long-term refrigerated storage for all strains in beetroot juice (Table 3). However, the number of sublethally injured cells decreased with in view of bacterial population dying (Figures 2(a) and 3(a)). Long-term storage of beetroot juice at 25°C showed that recovery of injured pathogen cells may occur, albeit spoiling of this product intermittently occurred (Table 4, Figures 2(b) and 3(b)).

Alkaline pH matrices have shown that it is incredibly challenging, to achieve microbial decontamination by HHP [20]. Despite the belief that HHP technology is intended for acid products, scientific researchers are still searching for the application of high pressure on this kind of matrices [6, 24, 25, 43]. Similarly to our study, Patterson et al. (2012) observed that the population of HHP-injured *E. coli* (500 MPa, 1 min.) had decreased during subsequent storage of carrot juice. Just after pressure treatment, inactivation was 1.82 log CFU/mL, while by day 10, the number of these bacteria reached undetectable levels, independent from the storage temperature. The same HHP condition inactivated cocktail of *L. monocytogenes* in carrot juice. During the 14 days of storage at any temperature, it remained below the limit of detection. The study of injury induced by HHP in microorganisms and subsequent recovery in fruit juices has been reported by several groups of researchers [21, 22, 34, 44, 45]. So far, the pressure-induced injured microorganisms in beetroot juice have been reported in few publications [31, 46–48]. Unfortunately, there is small data about the influence of storage. Buzrul et al. (2008) used mild HHP (350 MPa for 5 min.) to inactivate *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in kiwifruit (pH 3.32) and pineapple juice (pH 3.77). They investigate the effect of storage on the survival of these microorganisms, in above mentioned juices, at different temperatures (4°C, 20°C, 37°C). Inactivation increased more than 1.0 log CFU/mL, during storage at 4°C for 24 h, for both bacteria in both juices. During subsequent 3 weeks of storage, at all tested temperatures, no injury recovery was detected in both juices. The same phenomenon was observed by Jordan et al. (2001) for *E. coli* in orange, tomato, and apple juices.

Lots of studies confirmed that natural microbiota of HHP-treated vegetable juices may recover during storage. Picouet et al. (2015) monitored that three microbial groups were recovered, between 7th and 21st days of refrigerated storage, in HHP-treated carrot juice under 600 MPa for 5 min. Despite that, the total anaerobes bacteria remained below the detection limit in the first week of storage. On day 21, these bacteria reached 1.2 log CFU/mL in nonacidified (pH 6.48) and 4.3 log CFU/mL in acidified (pH 5.5) juice. In turn, yeast and molds counts reached an amount equal to or below 3.0 log CFU/mL. The authors concluded that acidification of carrot juice did not advantageously extend the shelf life of the product. Zhang et al. (2016) showed that indigenous microbiota of carrot juice, preserved by HHP (550 MPa, 6 min.), slightly increased after 20 days of storage at refrigerated temperature. Similarly to aforementioned, Patterson et al. (2012) observed that HHP-injured natural microbiota of carrot juice (500 and 600 MPa, 1 min) recovered faster at 12°C (7 log CFU/mL at the 10th day of storage), rather than at 4°C (3 log CFU/mL at the 22nd day of storage). Moreover, they noticed that pressure treatment, significantly delayed the recovery and growth of the surviving microorganisms, in reference to untreated juice sample. Sokołowska et al. (2014a) observed that total count of spoilage microorganism in HHP-beetroot juice (400 MPa, 10 min) was unchanged for 10 days of refrigerated storage. Then, there was an increase of contamination to more than 3.0 log CFU/mL. In turn, indigenous microbiota in fruit juices normally had been not recovered during long-term storage, even if juice was preserved by mild-HHP treatment [49, 50]. Kimura et al. (2017) observed that the degree of damage by HHP may differ cell-by-cell, and oxidative stress may continue after HHP treatment. Depending on the storage environment, resuscitation and recovered cells may multiply, before other injured cells complete resuscitation. Microbial cells, surviving pressurization, also became sublethally injured and developed sensitivity to environments, which the normal cells were resistant to [51].

The new edition of ISO 11290-1:2017 Microbiology of the food chain—Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp.—Part 1: Detection method, does not take into consideration resuscitation step. From human's health safety point of view it may be risky decision, especially due to the fact that systematic (invasive) form of listeriosis is now recognized as occurring more frequently in small outbreaks than previously recognized [52]. Due to the fact that injured bacterial cells display limited possibility, or even inability to grow on selective agars, and due to the above-mentioned fact, sublethally injured cells should require additional attention to quality control sectors of food operators. This aspect needs especially better understanding, in case if products are preserved by nonthermal alternative technologies, by virtue of induction of sublethal injuries. The Codex Alimentarius Commission (CAC) proposed the following criterion to characterize food products that support *L. monocytogenes* growth. As it was written in CAC: “a RTE food in which there is a greater than average of 0.5 log increase in the level of the organism, for at least the expected shelf life (as labeled by the manufacturer)

under reasonably foreseeable conditions of distribution, storage and use to consumption, including a safety margin” (CAC, 2009). Processed and ready-to-eat (RTE) foods with a prolonged shelf life under refrigeration are at risk products for listeriosis [40]. Uyttendaele et al. (2009) observed the growth of *L. monocytogenes* in three types of ready-to-eat products, stored under refrigerated temperature in challenge testing. They suggest that whether a food supports the growth of *L. monocytogenes*, or not is mainly determined by the physicochemical factors (pH, a_w , packaging atmosphere) of the food matrix, rather than being defined as such by the food type.

4. Conclusion

The results of this study indicate that carrot juice supports growth and regeneration of HHP-sublethally injured *L. innocua*. Based on the above data, HHP-treated beetroot juice can be classified as a safe product, while carrot juice may be classified as a high risk food. Our results confirmed that HHP-treated vegetable juices need to be kept in refrigerated conditions. However, more scientific studies need to be conducted to find an understanding of the bacterial mechanisms, involved in cell recovery during storage in food matrices.

Predictive microbiology is a useful method to help estimate food safety and shelf life of product, having established the foods’ intrinsic and extrinsic characteristics. However, good manufacturing practices (GMP), hygiene practices (GHP), the development, and implementation of procedures, based on HACCP, are fundamental in maintaining food safety, the setting, and validating of food shelf life.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Ethical Approval

Ethical clearance was not required and was not necessary for this study.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of the article.

Acknowledgments

This work was supported by the Prof. Waclaw Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology.

References

- [1] G. J. Kapadia, M. A. Azuine, R. Sridhar et al., “Chemoprevention of DMBA-induced UV-B promoted, NOR-1-induced TPA promoted skin carcinogenesis, and DEN-induced phenobarbital promoted liver tumors in mice by extract of beetroot,” *Pharmacological Research*, vol. 47, no. 2, pp. 141–148, 2003.
- [2] Z. Pietrzkowski, B. Nemzer, A. Sp et al., “Influence of betalain-rich extract on reduction of discomfort associated with osteoarthritis,” *New Medicin*, vol. 1, pp. 12–17, 2010.
- [3] T. Clifford, G. Howatson, D. J. West, and E. J. Stevenson, “The potential benefits of red beetroot supplementation in health and disease,” *Nutrients*, vol. 7, no. 4, pp. 2801–2822, 2015.
- [4] I. Domagała-Świątkiewicz and M. Gastoł, “Comparative study on mineral content of organic and conventional carrot, celery and red beet juices,” *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, vol. 11, no. 2, pp. 173–183, 2012.
- [5] “USDA Food composition Databases,” https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list_28.02.2018.
- [6] S. Zhu, C. Wang, H. S. Ramaswamy, and Y. Yu, “Phase transitions during high pressure treatment of frozen carrot juice and influence on *Escherichia coli* inactivation,” *LWT—Food Science and Technology*, vol. 79, pp. 119–125, 2017.
- [7] J. Czapski, K. Mikołajczyk, and M. Kaczmarek, “Relationship between antioxidant capacity of red beet juice and contents of its betalain pigments,” *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, vol. 59, no. 2, pp. 119–122, 2009.
- [8] J. Wruss, G. Waldenberger, S. Huemer et al., “Compositional characteristics of commercial beetroot products and beetroot juice prepared from seven beetroot varieties grown in Upper Austria,” *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 42, pp. 46–55, 2015.
- [9] C. Alkint, L. Wadsö, and I. Sjöholm, “Effects of modified atmosphere on shelf-life of carrot juice,” *Food Control*, vol. 15, no. 2, pp. 131–137, 2004.
- [10] G. M. Sapers, “Washing and sanitizing raw materials for minimally processed fruit and vegetable products,” in *Microbial Safety of Minimally Processed Foods*, J. S. Novak, G. M. Sapers, and V. K. Juneja, Eds., pp. 221–253, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 2003.
- [11] B. Sokolowska, M. Chotkiewicz, J. Niezgoda, A. Dekowska, and B. Sokołowska, “Evaluation of microbial contamination of commercially available unpasteurized, freshly squeezed fruit and vegetable juices,” *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, vol. 569, pp. 219–228, 2011.
- [12] M. Fonberg-Broczek, B. Windyga, G. Prestamo, H. Scieczynska, A. Grochowska, and K. Grecka, “Application of high pressure processing (HPP) for pasteurisation of fresh squeezed juices,” *Bromat. Chem. Toksykol suplement*, pp. 129–133, 2006.
- [13] M. D. R. Torres-Vitela, C. A. Gómez Aldapa, J. F. Cerna-Cortes, A. Villarruel-López, E. Rangel-Vargas, and J. Castro-Rosas, “Presence of indicator bacteria, diarrhoeagenic *Escherichia coli* pathotypes and *Salmonella* in fresh carrot juice from Mexican restaurants,” *Letters in Applied Microbiology*, vol. 56, no. 3, pp. 180–185, 2013.
- [14] Z. Libudzisz, K. Kowal, and Z. Zakowska, “Technical microbiology, Microorganisms in biotechnology, environmental protection and food production” (Polish), Wydawnictwo Naukowe PWN, t. II, pp. 235–288, 2008.
- [15] D. C. Machado, C. M. Maia, I. D. Carvalho, N. F. Da Silva, M. C. Dantas Porfírio Borges Andre, and Á. B. Serafini, “Microbiological quality of organic vegetables produced in soil treated with different types of manure and mineral fertilizer,” *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 37, no. 4, pp. 538–544, 2006.
- [16] K. Jones and J. Heaton, “Microbial contamination of fruit and vegetables,” *The Magazine of Health Protection Agency*, vol. 7, pp. 28–31, 2007.
- [17] K. R. Aneja, R. Dhiman, N. K. Aggarwal, V. Kumar, and M. Kaur, “Microbes associated with freshly prepared juices of citrus and

- carrots," *International Journal of Food Science*, vol. 2014, Article ID 408085, 7 pages, 2014.
- [18] J. W. Buck, R. R. Walcott, and L. R. Beuchat, "Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables," *Plant Health Progress*, vol. 4, no. 1, p. 25, 2003.
- [19] H.-W. Huang, S.-J. Wu, J.-K. Lu, Y.-T. Shyu, and C.-Y. Wang, "Current status and future trends of high-pressure processing in food industry," *Food Control*, vol. 72, pp. 1–8, 2017.
- [20] D. F. Farkas, "A short history of research and development efforts leading to the commercialization of high-pressure processing of foods," in *High Pressure Processing of Food*, V. M. Balasubramaniam, G. V. Barbosa-Cánovas, and H. L. M. Lelieveld, Eds., pp. 19–36, Principles, technology and applications, Springer, New York, NY, USA, 2016.
- [21] S. Buzrul, H. Alpas, A. Largeteau, and G. Demazeau, "Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in kiwifruit and pineapple juices by high hydrostatic pressure," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 124, no. 3, pp. 275–278, 2008.
- [22] A. Bayindirli, H. Alpas, F. Bozoglu, and M. Hizal, "Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices," *Food Control*, vol. 17, no. 1, pp. 52–58, 2006.
- [23] P. A. Picouet, C. Sárraga, S. Cofán, N. Belletti, and M. Dolors Guàrdia, "Effects of thermal and high-pressure treatments on the carotene content, microbiological safety and sensory properties of acidified and of non-acidified carrot juice," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 62, no. 1, pp. 920–926, 2015.
- [24] W. Żyngiel and J. Kolenda, "The influence of high pressure processing parameters on quality and stability of preserved carrot juices," *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, pp. 408–413, 2009.
- [25] Y. Zhang, X. Liu, Y. Wang, F. Zhao, Z. Sun, and X. Liao, "Quality comparison of carrot juices processed by high-pressure processing and high-temperature short-time processing," *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 33, pp. 135–144, 2016.
- [26] H.-W. Huang, H.-M. Lung, B. B. Yang, and C.-Y. Wang, "Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing," *Food Control*, vol. 40, no. 1, pp. 250–259, 2014.
- [27] M. F. Patterson, M. Quinn, R. Simpson, and A. Gilmour, "Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods," *Journal of Food Protection*, vol. 58, no. 5, pp. 524–529, 1995.
- [28] C.-Y. Wang, H.-W. Huang, C.-P. Hsu, and B. B. Yang, "Recent advances in food processing using high hydrostatic pressure technology," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 56, no. 4, pp. 527–540, 2016.
- [29] L. Espina, D. García-Gonzalo, and R. Pagán, "Detection of thermal sublethal injury in *Escherichia coli* via the selective medium plating technique: mechanisms and improvements," *Frontiers in Microbiology*, vol. 30, no. 7, p. 1376, 2016.
- [30] B. Yang, Y. Shi, X. Xia et al., "Inactivation of foodborne pathogens in raw milk using high hydrostatic pressure," *Food Control*, vol. 28, no. 2, pp. 273–278, 2012.
- [31] B. Sokołowska, S. Skapska, J. Niezgoda, M. Rutkowska, A. Dekowska, and S. J. Rzoska, "Inactivation and sublethal injury of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* by high hydrostatic pressure in model suspensions and beetroot juice," *High Pressure Research*, vol. 34, no. 1, pp. 147–155, 2014.
- [32] N. G. Besse, "Influence of various environmental parameters and of detection procedures on the recovery of stressed *L. monocytogenes*: A review," *Food Microbiology*, vol. 19, no. 2-3, pp. 221–234, 2002.
- [33] A. M. Wesche, J. B. Gurtler, B. P. Marks, and E. T. Ryser, "Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens," *Journal of Food Protection*, vol. 72, no. 5, pp. 1121–1138, 2009.
- [34] M. Linton, J. M. J. McClements, and M. F. Patterson, "Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during storage in pressure-treated orange juice," *Journal of Food Protection*, vol. 62, no. 9, pp. 1038–1040, 1999.
- [35] European Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs, 2005.
- [36] Guidance Note No. 18, Validation of product shelf-life, Revision 3, Food Safety Authority of Ireland, 2017.
- [37] A. Serraino and F. Giacometti, "Introduction to challenge test and microbiological characterisation of local products," *Italian Journal of Food Safety*, vol. 3, no. 1, pp. 34–35, 2014.
- [38] J. Nasiłowska, B. Sokołowska, and M. Fonberg-Broczek, "The impact of high hydrostatic pressure on inactivation and sublethal injury of foodborne pathogens in beetroot juice," *Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego*, vol. 71, no. 1, pp. 21–27, 2016.
- [39] J. Nasiłowska, B. Sokołowska, and M. Fonberg-Broczek, "The behaviour of *Listeria innocua* strains under pressure treatment - inactivation and sublethal injury," *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2018.
- [40] I. Mutaku, W. Erku, and M. Ashenafi, "Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh tropical fruit juices at ambient and cold temperatures," *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, vol. 56, no. 2, pp. 133–139, 2005.
- [41] I. Diakogiannis, C. Proestos, T. Varzakas, and P. Markaki, "Survival of *Listeria monocytogenes* in Tomato Juice at 5 and 30°C Storage," *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, vol. 5, no. 1, pp. 01–05, 2017.
- [42] O. A. Oyarzábal, M. C. L. Nogueira, and D. E. Gombas, "Survival of *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in juice concentrates," *Journal of Food Protection*, vol. 66, no. 9, pp. 1595–1598, 2003.
- [43] M. F. Patterson, A. M. McKay, M. Connolly, and M. Linton, "The effect of high hydrostatic pressure on the microbiological quality and safety of carrot juice during refrigerated storage," *Food Microbiology*, vol. 30, no. 1, pp. 205–212, 2012.
- [44] S. L. Jordan, C. Pascual, E. Bracey, and B. M. Mackey, "Inactivation and injury of pressure-resistant strains of *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes* in fruit juices," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 91, no. 3, pp. 463–469, 2001.
- [45] C. Garcia-Graells, K. J. A. Hauben, and C. W. Michiels, "High-pressure inactivation and sublethal injury of pressure-resistant *Escherichia coli* mutants in fruit juices," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, no. 4, pp. 1566–1568, 1998.
- [46] B. Sokołowska, S. Skapska, M. Fonberg-Broczek et al., "The effect of high hydrostatic pressure on the survival of *Saccharomyces cerevisiae* in model suspensions and beetroot juice," *High Pressure Research*, vol. 33, no. 1, pp. 165–171, 2013.
- [47] B. Sokołowska, S. Skapska, M. Fonberg-Broczek et al., "The impact of high hydrostatic pressure (HHP) on native microflora and the color of beetroot juice - a preliminary shelf-life study," in *Industrial, Medical and Environmental Applications of Microorganisms: Current Status and Trends*, A. Mendez-Vilas, Ed., vol. 33, pp. 380–384, Academic Publisher, Wageningen, Netherlands, 2014.
- [48] B. Sokołowska, Ł. Woźniak, S. Skapska, I. Porębska, J. Nasiłowska, and S. J. Rzoska, "Evaluation of quality changes of

- beetroot juice after high hydrostatic pressure processing,” *High Pressure Research*, vol. 37, no. 2, pp. 214–222, 2017.
- [49] E. Varela-Santos, A. Ochoa-Martinez, G. Tabilo-Munizaga et al., “Effect of high hydrostatic pressure (HHP) processing on physicochemical properties, bioactive compounds and shelf-life of pomegranate juice,” *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, vol. 13, pp. 13–22, 2012.
- [50] E. Juarez-Enriquez, I. Salmeron-Ochoa, N. Gutierrez-Mendez, H. S. Ramaswamy, and E. Ortega-Rivas, “Shelf life studies on apple juice pasteurised by ultrahigh hydrostatic pressure,” *LWT-Food Science and Technology*, vol. 62, no. 1, pp. 915–919, 2015.
- [51] H. Alpas, N. Kalchayanand, F. Bozoglu, and B. Ray, “Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 60, no. 1, pp. 33–42, 2000.
- [52] R. L. Buchanan, L. G. M. Gorris, M. M. Hayman, T. C. Jackson, and R. C. Whiting, “A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments,” *Food Control*, vol. 75, pp. 1–13, 2017.

dr hab. inż. Barbara Sokołowska, prof. IBPRS

Warszawa, dn. 30.06.2023

Zakład Mikrobiologii

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego

im. prof. Waława Dąbrowskiego - PIB

ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Justyna Nasiłowska, Barbara Sokołowska, Monika Fonberg-Broczek, 2018, **Long-Term Storage of Vegetable Juices Treated by High Hydrostatic Pressure: Assurance of the Microbial Safety**, BioMed Res. Int. 2, mój wkład w powstanie pracy polegał na pełnieniu funkcji promotora pracy doktorskiej, wsparciu merytorycznym oraz współudziale przy planowaniu badań i przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 10%.

Barbara Sokołowska

dr Monika Fonberg-Broczek

Warszawa, dn. 02.03.2023

Instytut Wysokich Ciśnień PAN

ul. Sokołowska 29/37, 01-142 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Justyna Nasiłowska, Barbara Sokołowska, Monika Fonberg-Broczek, 2018, **Long-Term Storage of Vegetable Juices Treated by High Hydrostatic Pressure: Assurance of the Microbial Safety**, BioMed Res. Int. 2, mój wkład w powstanie pracy polegał na udostępnieniu aparatury do wykonania doświadczeń związanych z wykorzystaniem wysokiego ciśnienia hydrostatycznego. Mój udział procentowy szacuję na 5%.

M. Fonberg-Broczek

Publikacja 3

Nasiłowska J., Sokołowska B., Fonberg-Broczek M. (2019)

Behavior of *Listeria innocua* strains under pressure treatment – in-activation and sublethal injury. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 69(1), 45–52

Behavior of *Listeria innocua* Strains Under Pressure Treatment – Inactivation and Sublethal Injury

Justyna Nasiłowska^{1*}, Barbara Sokołowska^{1,2}, Monika Fonberg-Broczek²

¹Prof. Waclaw Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology,
Department of Fruit and Vegetable Product Technology, 36 Rakowiecka str., 02–532 Warsaw, Poland

²Institute of High Pressure Physics, Polish Academy of Sciences,
Laboratory of Biological Materials, 29/37 Sokołowska str., 01–142 Warsaw, Poland

Key words: *Listeria innocua*, beetroot juice, high hydrostatic pressure, sublethal injury, transmission electron microscopy

The inactivation and sublethal injury of two strains of *Listeria innocua* (one collection strain and one wild strain isolated from beetroot juice) suspended in beetroot juice and in model solutions, after high hydrostatic pressure (HHP) were investigated. Changes within the population assessed by plating count methods of both *L. innocua* strains suspended in a buffer pH 4.0 were more noticeable than in the natural beetroot juice environment. In beetroot juice the lethal effect was reported after 1 min of pressure treatment at 400 MPa for the collection strain. In the case of the wild type strain, exposure to the maximal parameters of the compression process (400 MPa, 10 min) decreased the population number below 1 log (CFU/mL) but did not cause complete injury. The collection strain of *L. innocua* was easier to inactivate in beetroot juice than the strain isolated from this environment. The maximum level of sublethal injury was observed when the cells were suspended in a buffer pH 7.0. Structural damage in cell membranes after HHP processing was observed using a transmission electron microscope (TEM).

INTRODUCTION

Beetroot is a traditional vegetable distributed in many parts of the world and has been used commercially to produce juice and natural pigments. One of the leading red beet producers is Poland, where fresh beetroot juice has nowadays become increasingly popular because of its multiple health benefits, such as anticancer activity and protection against degenerative diseases [Clifford *et al.*, 2015]. Beetroot contains dietary fiber and carbohydrates of a moderate caloric value. It is a rich source of minerals and important vitamins, and therefore it can play an essential role in the composition of a well-balanced diet [USDA Food Composition Database, 2018; Zielińska-Przyjemska *et al.*, 2009]. Due to the fact that edible parts of root vegetables have a direct contact with soil, beetroot juice is one of the most contaminated among the commercially available fresh juices and can be a source of undesirable microbiota including pathogenic microorganisms [Sapers, 2003; Sokołowska *et al.*, 2011]. One of the most virulent foodborne pathogens, widely distributed in the natural environment, is *Listeria monocytogenes*. It has been detected in fruit and vegetables that are contaminated by the soil or by manure used as a fertilizer. Among the investigated samples of unpasteurized commercial root vegetable and fruit juices, 29% (n=17) have been reported to contain *Listeria*

monocytogenes [Sokołowska *et al.*, 2011]. This pathogen can survive short pasteurization or freezing, and can be resistant to treatment with food preservatives. Moreover, it can grow in acidic foods traditionally considered as of low risk [Jordan *et al.*, 2001]. The infective dose of *L. monocytogenes* depends on the resistance of the individual host. Fresh fruit and vegetables which are consumed without any further thermal treatment, and are contaminated with *L. monocytogenes* at more than 100 CFU/g, are considered to pose a direct risk to human health [Commission Regulation 2073/2005]. Exceeding this number is dangerous, especially for people with compromised immunity, children, the elderly and pregnant women, as it may induce listeriosis and even sepsis [Goulet *et al.*, 2008].

The High Hydrostatic Pressure (HHP) is a technology used worldwide for the preservation of various commercial products, including vegetable juices. However, this technology has not yet been implemented on the industrial scale in Poland. HHP allowed reducing counts of microbes responsible for spoilage and for shortening the shelf-life of beetroot juice [Sokołowska *et al.*, 2013, 2014, 2017], while not markedly changing the sensory and nutritional attributes of the product. Mild, non-thermal technologies used in food preservation, apart from the inactivation, trigger the sublethal injury of bacterial cells. Injury caused by high hydrostatic pressure has been observed in many bacterial cells [Patterson *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2012; Sokołowska *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016]. The mechanism of microbial inactivation by HHP is re-

* Corresponding Author: Tel.: +48 22 606 3605;
E-mail: nasilowska@ibprs.pl (J. Nasiłowska)

lated to the morphological changes in the cell, modification of the cytoplasmic membrane, damage to the genetic mechanism, and adverse biochemical reaction [Hoover *et al.*, 1989]. Changes in the bacterial cell can be reversible or irreversible depending on the level of environmental stress and physiological condition of the cell. Even though the membrane damage plays a major role in HHP inactivation, the partial loss of its functionality does not always lead to cell death. In a consequence, some of the cells in the population will be sublethally injured [Wesche *et al.*, 2009]. However, the sublethally injured cells may reveal increased sensitivity to inhibitors, which are ingredients of selective agar media [Espina *et al.*, 2016]. The injured survivors are able to recover and resume growth if suitable environmental conditions emerge, and therefore may become dangerous to customers [Mackey *et al.*, 2000]. This is the reason why appropriate identification and quantification of the sublethally injured population play a key role in food safety. An indirect method for evaluating the number of sublethally injured cells is the plating technique which utilizes a selective medium with the addition of NaCl [Yuste *et al.*, 2004; Sokołowska *et al.* 2014], because immediately after HHP processing the damaged cells have no, or a lower, ability to grow on this medium.

This work describes results of the investigation of the survival, sublethal injury, and diversity of the resistance of *Listeria innocua* strains in pasteurized beetroot juice and in model solutions: buffers pH 4.0 and 7.0, after high hydrostatic pressure treatment.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms and growth conditions

Listeria innocua was used in this study. This bacteria is physiologically very close to the previously mentioned *L. monocytogenes*, and is frequently found in the same food products, therefore it is often used for experiments [Escobar *et al.*, 2017].

Two strains of *Listeria innocua* were used in this study: CIP80.11T obtained from the Culture Collection of the Institut Pasteur (Paris, France) and 23/2013 (wild type strain) isolated from unpasteurized Polish beetroot juice obtained from the own collection of the Department of Fruit and Vegetable Product Technology at IAFB (Warsaw, Poland). The strains were stored in Cryobank at a temperature below $-27^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Broth subcultures were prepared by inoculating a tube containing 10 mL of sterile Brain Heart Infusion (BHI) broth (BioMerieux, l'Etoile, France) with a pure culture immobilized on sterile beads. After inoculation, the tubes were incubated at 37°C for 24 h and then each overnight culture was moved with a 0.1 mL loop on a Petri dish with Tryptic Soy Yeast Extract (TSYE) agar (Biocar Diagnostics, Beauvais, France). Next, the culture from the plate with a 0.1 mL loop was added to 250 mL Erlenmeyer flasks containing 200 mL of Tryptic Soy Broth with Yeast Extract (TSBYE) (Biocar Diagnostics, Beauvais, France) to prepare the second subculture, which was incubated at 37°C for 18 h to obtain the stationary phase culture. Then, 10 mL of the second subculture were added to fresh sterile broth (TSB or TSYEB) and incubated at 37°C for 18 h. The cultures were then harvested by centrifugation ($4000 \times g$, 10 min, 4°C). The sedimented cells were

aseptically re-suspended in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) and again centrifuged. The washing procedure was repeated twice. After that, model suspensions of *L. innocua* were prepared in PBS (1:9, v/v). Just before HHP treatment, McIlvaine buffers (0.1 M citric acid, 0.2 M disodium phosphate) in pH 4.0 and pH 7.0, and beetroot juice were inoculated with *L. innocua* cells in a concentration of about 10^7 CFU/mL and transferred into sterile polyethylene tubes (Sarstedt, Newton, USA) in 13 mL portions in duplicate.

Model suspensions and beetroot juice

McIlvaine buffers pH 4.0 and pH 7.0, and pasteurized beetroot juice, acidified with citric acid to pH from 3.98 to 4.17 (produced by Victoria Cymes, Poland) were used.

HHP treatment

High pressure treatment was performed using a U 4000/65 device (Unipress, Warsaw, Poland). The apparatus was capable of operating up to 600 MPa, at temperatures ranging from -10°C to $+80^{\circ}\text{C}$. The maximum volume of the treatment chamber was 0.95 L. The pressure-transmitting fluid was distilled water and polypropylene glycol (1:1, v/v). Each two independent samples were treated in two independent cycles. The treatment was performed at pressures of 200 MPa, 300 MPa, and 400 MPa, at 20°C for 1, 5, and 10 min. Pressure of up to 400 MPa was generated in 70–80 s and the release time was 2–4 s. The total process time did not include the come-up and come-down time of pressurization. After the treatment, the samples were removed from the chamber and placed immediately on ice. The control samples were unpressurized.

Plate count analytical methods

The HHP-treated samples were analyzed immediately after processing. Ten-fold serial dilutions in Tryptone Salt broth (Biocar Diagnostics, Beauvais, France) of each sample were prepared. Appropriate dilutions of samples were spread on agars. Counts of total viable cells were determined by spread plate on TSYE agar, while TSYE agar supplemented with 5% NaCl (POCh, Gliwice, Poland) was used to determine uninjured cells in the population [Yuste *et al.*, 2004]. This concentration of NaCl was estimated in the laboratory as the maximum concentration that did not change the morphology and number of unstressed *L. innocua* cells. The number of sublethally injured survivors was estimated by the difference between the counts of total viable and uninjured cells in the population [Yuste *et al.*, 2004; Espina *et al.*, 2016]. Plates with TSYE agar were incubated for 24 h/ 37°C , and these with TSYE agar+5% NaCl for 48 h/ 37°C [Espina *et al.*, 2016]. The plates containing less than 300 CFU/mL were selected for counting [Yuste *et al.*, 2004].

Cell morphology assessment by transmission electron microscopy (TEM)

After exposure to 400 MPa for 5 min, the bacteria cells in the PBS buffer (pH 7.2) were fixed with 2.5% glutaraldehyde cacodylic buffer and incubated for one hour, then washed with 0.1 M cacodylic buffer. Next, they were postfixed in 1% OsO_4 in ddH_2O for 1 h and washed three times in ddH_2O . Af-

ter postfixation, the samples were dehydrated through a graded series of EtOH (30% – 10 min, 50% – 10 min, 70% – 24 h, 80% – 10 min, 90% – 10 min, 96% – 10 min, anhydrous EtOH – 10 min, acetone – 10 min) and infiltrated with epon resin in acetone (1:3 – 30 min, 1:1 – 30 min, 3:1 – 2h), infused twice for 24 h in pure epon resin and polymerized at 60°C for 24 h. Next, 60 nm sections were prepared using RMC ultramicrotome MT-X (RMC Boeckeler Instruments, Tucson, USA), contrasted with uranyl acetate and lead citrate according to Reynolds [1983], and examined on LIBRA 120 electron microscope produced by Zeiss (Oberkochen, Germany). Images were captured with the Slow-Scan CCD camera (Proscan) using EsiVision Pro 3.2 software (Soft Imaging Systems GmbH). Measurements were performed using the analySIS® 3.0 image-analytical software (Soft Imaging Systems GmbH, Münster, Germany).

Statistical analysis

The results of survival and sublethal injuries of bacteria were analyzed by two-way ANOVA statistical model with Scheffe’s test using Statistica version 13 (TIBCO Software

Inc., Palo Alto, CA, USA). Statistical comparison was made for results obtained at different times of the process. The differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of HHP on bacterial cells

The results of the experiment showed that the inactivation and injury of *L. innocua* cells subjected to HHP depended on the origin of the strain, as well as the medium and parameters of the process. Survival rates of the population under the studied conditions and in all media tested are presented in Figures 1–3.

For both strains suspended in beetroot juice, increasing the pressurization time from 1 to 10 min under the pressure of 200 MPa had no significant effect on their survival ($p \geq 0.05$) (Figure 1). The maximum reduction was less than 1.1 log (CFU/mL). A higher reduction was achieved when the pressure was increased up to 300 MPa. After 5 min of treatment, the population of the collection strain suspended in beetroot

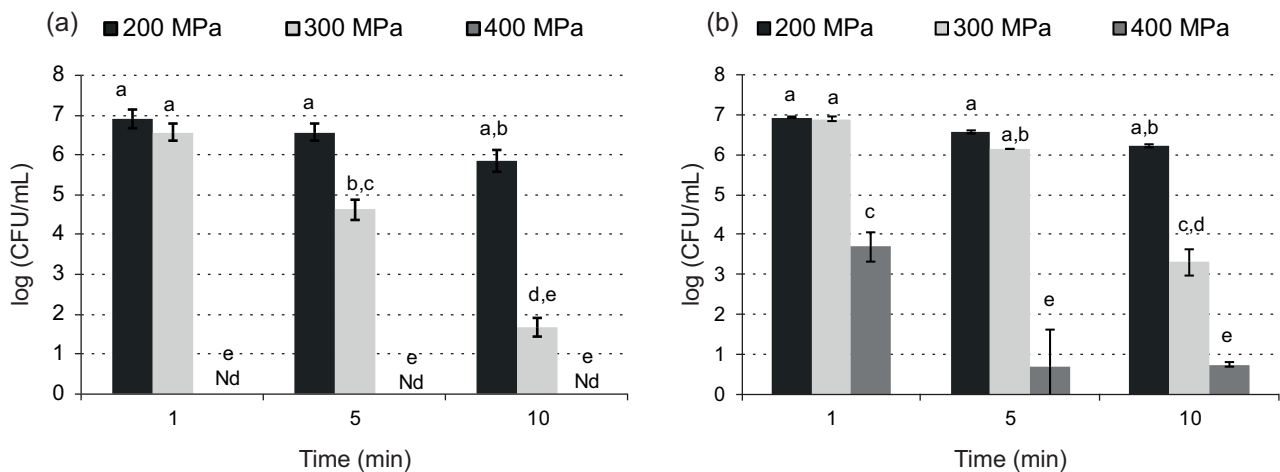


FIGURE 1. Effect of high hydrostatic pressure on the survival of *L. innocua* CIP80.11T (a) and wild type strain 23/2013 (b) in beetroot juice. The bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$; Nd – not detected.

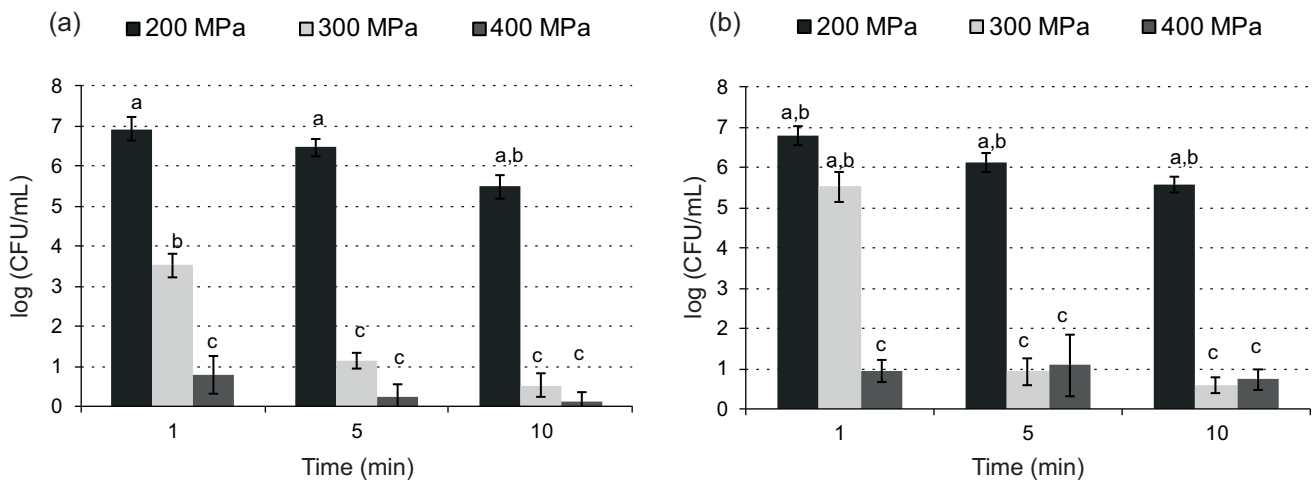


FIGURE 2. Effect of high hydrostatic pressure on the survival of *L. innocua* CIP80.11T (a) and wild type strain 23/2013 (b) in buffer pH 4. The bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

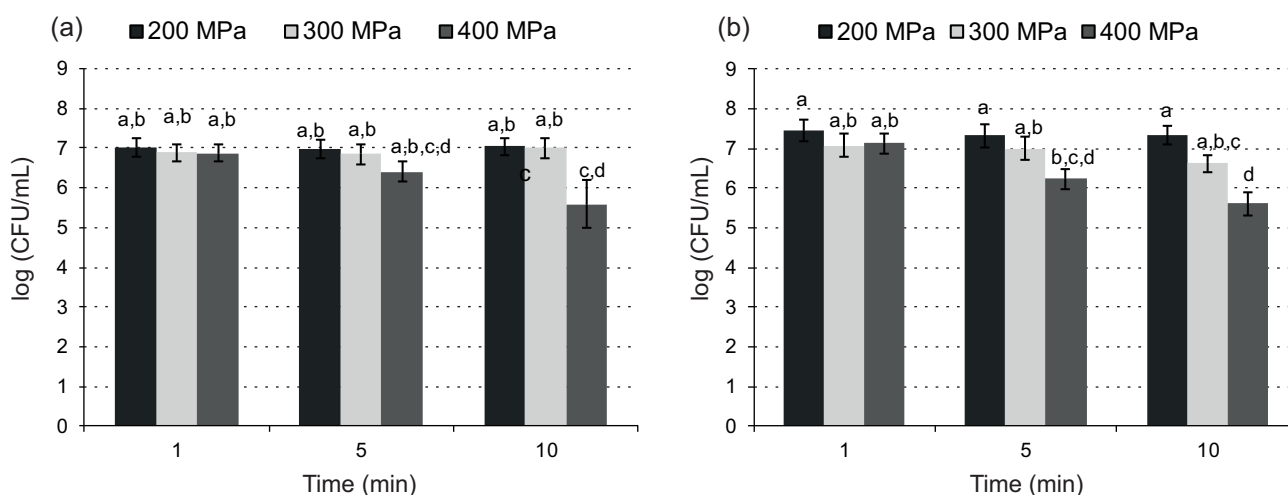


FIGURE 3. Effect of high hydrostatic pressure on the survival of *L. innocua* CIP80.11T (a) and wild type strain 23/2013 (b) in buffer pH 7. The bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

juice decreased by 2.3 log (CFU/mL), while under the same conditions the reduction for the wild type strain was 0.9 log (CFU/mL). When the treatment time was extended up to 10 min, the inactivation of both strains increased by 2.9 log (CFU/mL). In the beetroot juice samples, after the application of 400 MPa for 1 min the collection strain of *L. innocua* was not detected, while the inactivation of the wild type strain was 3.3 log (CFU/mL). Increasing the time of exposure up to 10 min resulted in a significant decrease ($p < 0.05$) in the population number of the wild type strain but did not provide its complete inactivation. Our previous studies have shown that the HPP treatment at 400 MPa and 20°C for 10 min of the same beetroot juice (pH 4.18, °Bx 12.35), resulted in 6.2 log (CFU/mL) reduction of *E. coli* ATCC 7839, whereas HPP treatment at 300 MPa and 20°C for 10 min caused about 3.5 log (CFU/mL) reduction of *Saccharomyces cerevisiae* NCFB 3191 [Sokołowska *et al.*, 2013, 2014].

Changes within the population of *L. innocua* suspended in buffer pH 4.0 were more noticeable (Figure 2) than in a natural beetroot juice environment, however there were no significant differences between both strains ($p \geq 0.05$). This was most probably due to the presence of molecules, such as lipids and carbohydrates, in product. This modified the effect of HHP on microorganisms, which was confirmed in our previous study [Sokołowska *et al.*, 2013]. After 10 min of the treatment under 200 MPa, the population numbers of the collection and wild type strains decreased by 1.4 and 1.6 log (CFU/mL), respectively. When the samples of the collection strain in an acid model solution were treated under 300 MPa for 1 min, their inactivation reached 3.3 log (CFU/mL). Under the same conditions, the level of reduction of the wild type strain was only 1.6 log (CFU/mL). A decline in the population numbers of both strains at the level of about 1 log (CFU/mL) was observed after 5 min of the treatment. Further enhancement of the process parameters had no significant effect on the studied bacterial populations ($p \geq 0.05$). Jofré *et al.* [2010] studied the inactivation of five strains of *L. monocytogenes* of different origins suspended in a complex medium (pH: 5.1; 6.3, 7.4). The results have demon-

strated that treatment at 400 MPa for 10 min greatly affected the viability of each strain. We have shown similar findings in an acid model solution. However, the results of bacterial inactivation, in a near-neutral pH environment, were totally different. In our study, the survival rates of *L. innocua* suspended in buffer 7.0 under pressure reaching up to 400 MPa for 5 min have shown no significant differences ($p \geq 0.05$) (Figure 3). Maximum inactivation of both strains was observed after the treatment at 400 MPa for 10 min and was below 1.5 log (CFU/mL). On the contrary to our results, Patterson *et al.* [1995] showed 5 log (CFU/mL) reduction of *L. monocytogenes* in a phosphate buffer (pH 7) after the treatment at 375 MPa for 15 min. In another study, it has been reported that the treatment at 207 MPa for 10 min at 25°C, caused a 0.7 log (CFU/mL) reduction in population numbers of two strains of *L. monocytogenes* suspended in a peptone solution (pH 7.2) [Alpas *et al.*, 2000]. Stewart *et al.* [1997] described the effect of HHP on the injury and destruction of two strains of *L. monocytogenes* (Scott A and CA) in buffer suspensions. They observed complete sterility in buffer pH 4.0 in the case of the samples pressurized at 404 MPa for 10 min. However, under the same HHP conditions in buffer 6.0, both strains were reduced by 4.0 log (CFU/mL) and 6.0 log (CFU/mL), respectively. On the other hand, the number of cells of both strains decreased by 5.0 log (CFU/mL) in pH 4.0 and by 3.0 log (CFU/mL) in pH 6.0 upon pressurization at 300 MPa, 25°C for 10 min [Stewart *et al.*, 1997].

Sublethal injury to bacterial cells

Microorganisms are said to be sublethally injured if they survive an inactivation treatment. Some of the damages might be repaired, especially while microorganisms are stored under favorable conditions [Jofré *et al.*, 2010]. Pressure treatment at 300–600 MPa, at ambient temperature for a few minutes destroys pathogenic bacteria, such as *Listeria*, *Escherichia*, *Salmonella*, as well as causes sublethal injuries [Patterson *et al.*, 1995]. However, under these conditions some bacteria are sublethally injured. This phenomenon has been confirmed in our study (Table 1). As aforementioned, survivors may re-

TABLE 1. The level of sublethal injuries of *L. innocua* strains after HHP treatment.

Strains/HHP parameters	200 MPa			300 MPa			400 MPa		
	1 min	5 min	10 min	1 min	5 min	10 min	1 min	5 min	10 min
Sublethal injuries in beetroot juice (log CFU/mL)									
<i>Listeria innocua</i> CIP 80.11T	0.11±0.26 ^a	0.08±0.23 ^a	0.37±0.26 ^a	-0.03±0.27 ^a	0.72±0.26 ^a	0.58±0.69 ^a	Nd ^a	Nd ^a	Nd ^a
<i>Listeria innocua</i> – wild type strain 23/13	-0.02±0.00 ^a	0.01±0.05 ^a	-0.09±0.09 ^a	0.13±0.04 ^a	0.10±0.00 ^a	2.34±0.26 ^b	0.83±0.13 ^{a,b}	-0.05±1.02 ^a	0.01±0.17 ^a
Sublethal injuries in McIlvain buffer pH 4.0 (log CFU/mL)									
<i>Listeria innocua</i> CIP 80.11T	-0.06±0.27 ^a	0.05±0.25 ^a	0.12±0.22 ^a	0.54±0.29 ^a	0.45±0.67 ^a	0.54±0.00 ^a	0.81±0.00 ^a	0.24±0.00 ^a	0.15±0.00 ^a
<i>Listeria innocua</i> – wild type strain 23/13	-0.19±0.22 ^a	-0.09±0.24 ^a	0.07±0.26 ^a	0.42±0.39 ^a	0.28±0.92 ^a	0.45±0.21 ^a	0.30±0.16 ^a	0.30±1.01 ^a	0.42±0.34 ^a
Sublethal injuries in McIlvain buffer pH 7.0 (log CFU/mL)									
<i>Listeria innocua</i> CIP 80.11T	0.10±0.21 ^a	0.09±0.28 ^a	0.17±0.25 ^a	0.14±0.24 ^a	0.17±0.26 ^a	0.31±0.27 ^a	0.67±0.25 ^{a,b}	2.64±0.34 ^c	3.83±0.32 ^d
<i>Listeria innocua</i> – wild type strain 23/13	0.04±0.28 ^a	0.08±0.20 ^a	-0.01±0.25 ^a	0.03±0.23 ^a	0.05±0.22 ^a	0.24±0.27 ^a	0.28±0.24 ^a	1.21±0.23 ^b	2.39±0.25 ^c

All data were the mean ± SD, n=2. Values in rows (a-d) denoted with different letter are significantly different at p<0.05. Nd: not detected.

veal increased sensitivity to inhibitors, such as sodium chloride [Mackey, 2000]. In our study, it has been observed that the maximum level of sublethal injury occurred when the cells were suspended in buffer pH 7.0 (Table 1) and exposed to the pressure of 400 MPa for 10 min. The level of sublethal injury was 3.83 log (CFU/mL) and 2.39 log (CFU/mL) for the collection strain and wild type strain, respectively. Pressure treatment at 200 MPa and 300 MPa in buffer pH 7.0 caused no significant changes ($p \geq 0.05$) in the levels of sublethal injury of bacterial cells. The same observation was made in buffer pH 4.0 ($p \geq 0.05$) (Table 1). In turn, beetroot juice samples exposure to 300 MPa for 10 min significantly ($p < 0.05$) affected the level of sublethal injury of the wild type strain compared with the collection strain (Table 1). Sokolowska *et al.* [2014] confirmed that the pressure of 400 MPa triggered sublethal injury of *E. coli* cells in PBS. After 5 and 10 min of HHP treatment, 2.4 log (CFU/mL) and 2.7 log (CFU/mL) of sublethally injured cells were observed, while in beetroot juice the counts of injured cells reached 1.5 log (CFU/mL) and 0.8 log (CFU/mL), respectively. On the other hand, the application of 400 MPa for 10 min on five strains of *L. monocytogenes* suspended in a complex medium caused that the number of sublethally injured cells in population was less than 1 log (CFU/mL) [Jofré *et al.*, 2010]. The number of sublethally injured survivors in the population depends on high pressure treatment parameters, as well as on the type of microbiota and medium. In some cases, the level of sublethally injured cells might be almost 100%. The adequate identification and quantification of the sublethally injured population plays an important role in food safety.

TEM observations

The character of sublethal injuries of *L. innocua* triggered by high hydrostatic pressure, was illustrated by TEM microscopy. Changes in *L. innocua* cells morphology are shown in Figure 4. TEM images of untreated samples demonstrated intact, characteristic rod-shaped *L. innocua* cells, single or

dividing. Cell membrane and walls were clearly defined with centrally located genome surrounded by the integrated cytoplasmic area and tickly packed ribosomes (Figure 4 a,b). The mechanisms of microbial inactivation by HHP have been mostly associated with the damage of cell membrane, as the major target of pressure treatment. Loss of membrane integrity and swelling leads to the leakage of cellular materials and nucleoid condensation [Hauben *et al.*, 1996; Mañas & Mackey, 2004]. According to plate count results, the reduction of both strains suspended in buffer pH 7.0 after HHP treatment at 400 MPa for 5 min was less than 1 log (CFU/mL). The level of sublethal injury was 2.64 log (CFU/mL) and 1.21 log (CFU/mL) for collection and wild type *L. innocua* strain, respectively (Figure 3). It was coherent with the results which we achieved using the transmission electron microscopy technique. Most of the cells in the population observed by TEM had an intact cell membrane. Only a few cells of *L. innocua* wild type strain have presented surface damage (Figure 4 f). TEM observations confirmed aggregation of cytoplasm. Disorganization of the genome area containing fibrillar regions was observed in all populations of both strains (Figure 4 c,d,e,f). Alterations in the appearance of the interior of the *Escherichia coli* cells were reported after HHP treatment at 300 and 600 MPa for 5 min [Prieto-Calvo *et al.*, 2014] and of *Listeria monocytogenes* cells interior after the treatment at 450 MPa for 5 min [Huang *et al.*, 2015]. Monitoring of the cellular ultrastructure by TEM showed the cellular enlargement, disruption of cellular membranes, condensation of the cytoplasmic material and disorganization of the genome area [Huang *et al.*, 2015; Prieto-Calvo *et al.*, 2014]. Mackey *et al.* [1994] observed that cells of *L. monocytogenes* treated under 250 MPa were characterized with unusual symmetrical areas in the cytoplasm. These changes were related to the deprivation of ribosomes, resembling gas bubbles, which could have been due to the osmotic effects or phase changes in the membrane. Under the same treatment conditions, amorphous compacted regions were

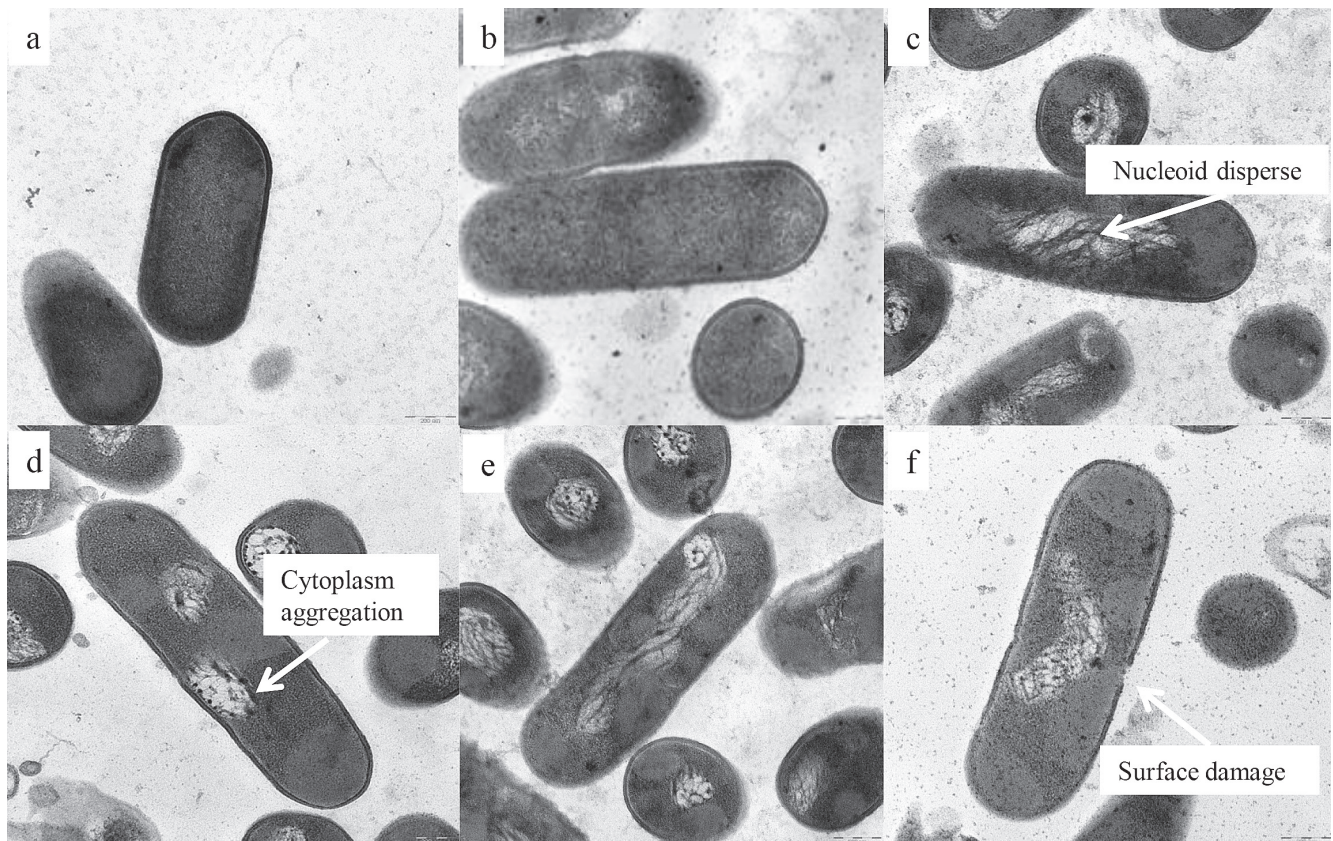


FIGURE 4. TEM images of untreated *L. innocua* strains (a) CIP80.11T and (b) wild type strain 23/2013 and after exposure to 400 MPa for 5 min (c-d) and (e-f) respectively. Scale bar, 200 nm. Representative images of the samples are shown.

noticed in *Salmonella* Thompson. It was probably induced by denaturation of cytoplasmic protein [Mackey *et al.*, 1994]. Increased pressure up to 500 MPa resulted in extreme condensation of the cytoplasm, whilst the outline of the cells was intact [Mackey *et al.*, 1994].

Variation in resistance to HHP

Numerous studies have demonstrated that variations in the resistance of microorganisms to high pressure occurred not only among the different species of bacteria, but also among the strains belonging to the same species [Alpas *et al.*, 1999; Jordan *et al.*, 2001; Boeijen *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2015]. It has been reported that some bacterial strains with very high pressure resistance were isolated from the natural environment. Because of biodiversity of microorganisms, the results that were obtained in different studies varied significantly [Alpas *et al.*, 2000]. The studies that we have conducted on *Listeria*, which was suspended in beetroot juice, showed a certain phenomenon. The collection strain was easier to inactivate than the strain isolated from the natural environment (Figure 1). Moreover, the wild type strain was not completely inactivated in an acidic medium, even being treated in a very harsh way (Figure 2). Alpas *et al.* [1999] studied the variation in pressure resistance among nine strains of *L. monocytogenes*. They observed that after pressure treatment at 345 MPa for 5 min at 25°C, some strains were more resistant to pressure than others. The viability loss of cells ranged from 0.9 to 3.5 log (CFU/mL). In another work, all the survivors of two strains of *L. mono-*

cytogenes suspended in a peptone solution were completely injured after being exposed to the aforementioned factors. The diversity between 24 piezotolerant variants of *L. monocytogenes*, which were resistant to pressure treatment at 350 MPa was examined by Boeijen *et al.* [2010]. Those 24 strains were compared with the wild type strain. In most cases the wild type strain revealed greater sensitivity than the used variants. Most of them were also resistant to other stresses besides HHP, such as high temperature and low pH. Differences among the variants were observed in *e.g.* acid resistance, growth rate or motility. The authors suggested that this population diversity may be essential to the persistence of pathogens such as *L. monocytogenes* in a range of environments [Boeijen *et al.*, 2010].

CONCLUSIONS

It has been confirmed in our study that high pressure can result in the loss of viability of *L. innocua* cells. It was found that the level of reduction by HHP treatment at 20°C in beetroot juice and buffer solutions was strictly dependent on a couple of factors, including: the pressure applied, the duration of the process, as well as the origin of the strain. In spite of the fact that the pH of both media was similar, the survivability of both strains was greater in beetroot juice than in the buffer. It can be explained by the content of organic compounds which are known to be able to produce a protective layer for bacterial cells which could inhibit the effect of pressure treatment.

On an industrial scale, juices are exposed to pressures of 300–600 MPa for a few minutes at 20°C or below. This environment is sufficient to reduce the number of spoilage microorganisms such as: yeast, moulds, and lactic acid bacteria. However, the results of this study have proved that the mentioned above factors are not always sufficient enough to inactivate pathogens and ensure consumer safety.

To attain safe standards of high pressure processed foods, particular attention should be paid to the potential presence of sublethal injured cells. Moreover, baroresistance among microbial species and strains should also be taken into consideration. The conditions of pressure processing should be properly selected for the type of product as well as the expected conditions and duration of storage. It should be particularly taken into account that the possibility of recovery of sublethally injured cells may occur. Therefore, it is worth considering the coupling of HHP and other treatments to ensure microbiological stability and health safety of juices and beverages from beetroots or other root vegetables.

RESEARCH FUNDING

This work was funded from statutory funds of prof. Wacław Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology, Warsaw, Poland.

CONFLICT OF INTEREST

Authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Ray, B. (2000). Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure – resistant and pressure – sensitive strains of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 60, 33–42.
- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Sikes, A., Dunne, C.P. (1999). Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food – borne pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 4248–4251.
- Boeijen, I.K.H. van, Chavarroche, A.A.E., Valderrama, W.B., Moezelaar, R., Zweitering, 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.
- Clifford, T., Howatson, G., West, D.J., Stevenson, E.J. (2015). The potential benefits of red beetroot supplementation in health and disease. *Nutrients*, 7(4), 2801–2822
- Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs
- Escolar, C., Gómez, D., Ruiz-García, M.D.R., Conchello, P., Herrera, A. (2017) Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* isolated from ready-to-eat products of animal origin in Spain. *Foodborne Pathogens and Diseases*, 14(6), 357–363.
- Espina, L., García-Gonzalo, D., Pagan, R. (2016). Detection of thermal sublethal injury in *Escherichia coli* via the selective medium plating technique: mechanisms and improvements. *Frontiers in Microbiology*, 7, art. no. 1376.
- Goulet, V., Hedberg, C., Le Monnier, A., de Valk, H. (2008). Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerging Infectious Diseases*, 14(5), 734 – 740.
- Hauben, K.J.A., Bartlett, D.H., Soontjens, C.C.F., Cornelis, K., Wuytack, E.Y., Michiels, C.W. (1997). *Escherichia coli* mutants resistant to inactivation by high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(3), 945–950.
- Hoover, D.G., Metrick, C., Papineau, A.M., Farkas, D.F., Knorr, D. (1989). Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technology*, 43(3), 99–107.
- Huang, H.W., Lung, H.M., Chang, Y.H., Yang, B.B., Wang, Ch.Y. (2015). Inactivation of pathogenic *Listeria monocytogenes* in raw milk by high hydrostatic pressure. *Foodborne Pathogens and Diseases*, 12(2), 139–144.
- Jofré, A., Aymerich, T., Bover-Cid, S., Garriga, M. (2010). Inactivation and recovery of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* after high hydrostatic treatments up to 900 MPa. *International Microbiology*, 13(3), 105–112.
- Jordan, S.L., Pascual, C., Bracey, E., Mackey, B.M. (2001). Inactivation and injury of pressure – resistant strains of *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes* in fruit juice. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 463–469.
- Mackey, B.M., Forestière, K., Issaacs, N.S., Stenning, R., Brooker, B. (1994). The effect of high hydrostatic pressure on *Salmonella thompson* and *Listeria monocytogenes* examined by electron microscopy. *Letters in Applied Microbiology*, 19(6), 429–432.
- Mackey, B.M., Injured bacteria (2000). In B.M. Lund, T.C. Baird-Parker, G.W. Gould (eds). *The Microbial Safety and Quality of Food*, vol. 1. Aspen Publisher Inc., Gaithersburg, Maryland, USA, pp. 315–341.
- Mañas, 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.
- Patterson, M.F, Quinn, M., Simpson, R., Gilmour, A. (1995). Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatments in phosphate – buffered saline and foods. *Journal of Food Protection*, 58(5), 524–529.
- Prieto-Calvo, M., Prieto, M, Lopez, M., Alvarez-Ordóñez, A. (2014). Effects of high hydrostatic pressure on *Escherichia coli* ultrastructure, membrane integrity and molecular composition as assessed by FTIR spectroscopy and microscopic imaging techniques. *Molecules*, 19, 21310–21323.
- Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as electron-opaque stain for electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 17, 208–213.
- Sapers, G.M. (2003). Washing and sanitizing raw materials for minimally processed fruit and vegetable products. In J.S. Novak, G. M. Sapers, V.K. Juneja (eds.). *Microbial Safety of Minimally Processed Foods*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 221–253.
- Sokołowska, B., Woźniak, Ł., Skąpska, S., Porębska, I., Nasilowska, J., Rzoska, S.J. (2017). Evaluation of quality changes of beetroot juice after high hydrostatic pressure processing. *High Pressure Research*, 37(2), 214–222.

22. Sokołowska, B., Skąpska, S., Niezgoda, J., Rutkowska, M., Dekowska, A., Rzoska, S.J. (2014). Inactivation and sublethal injury of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* by high hydrostatic pressure in model suspensions and beetroot juice. *High Pressure Research*, 34(1), 147–155.
23. Sokołowska, B., Skąpska, S., Fonberg-Broczek, M., Niezgoda, J., Rutkowska, M., Chotkiewicz, M., Dekowska, A., Rzoska, S.J. (2013). The effect of high hydrostatic pressure on the survival of *Saccharomyces cerevisiae* in model suspensions and beetroot juice. *High Pressure Research* 33(1), 165–171.
24. Sokołowska, B., Chotkiewicz, M., Niezgoda, J., Dekowska, A. (2011). Evaluation of microbial contamination of commercially available unpasteurized, freshly squeezed fruity and vegetable juice. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 569, 219–228 (in Polish; English abstract).
25. Stewart, C.M., Jewett, F.F., Dunne, C.P., Hoover, D.G. (1997). Effect of concurrent high hydrostatic pressure, acidity and heat on the injury and destruction of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Safety*, 17(1), 23–36.
26. USDA Food Composition Databases [https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list_28.02.2018].
27. Wang, C.Y., Huang, H.W., Hsu, C.P., Yang, B.B. (2016). Recent advances in food processing using high hydrostatic pressure technology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(4), 527–540.
28. Wesche, A.M., Gurtler, J.B., Marks, B.P., Ryser, E.T. (2009). Stress, sublethal injury, resuscitation and virulence of bacterial foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 72(5), 1121–1138.
29. Yang, B.W., Shi, Y., Xia, X.D., Xi, M.L., Wang, X., Ji, B.Y., Meng, J.H. (2012). Inactivation of foodborne pathogens in raw milk using high hydrostatic pressure. *Food Control*, 28(2), 273–278
30. Yuste, J., Capellas, M., Fung, D.Y.C., Mor-Mur, M. (2004). Inactivation and sublethal injury of foodborne pathogens by high pressure processing: Evaluation with conventional media and thin agar layer method. *Food Research International*, 37(9), 861 – 866.
31. Zielińska-Przyjemska, M, Olejnik, A., Dobrowolska-Zachwieja, A., Grajek, W. (2009). *In vitro* effects of beetroot juice and chips on oxidative metabolism and apoptosis in neutrophils from obese individuals. *Phytotherapy Research*, 23(1), 49–55.

Submitted: 1 March 2018. Revised: 17 July 2018. Accepted: 17 October 2018. Published on-line: 22 January 2019.

dr hab. inż. Barbara Sokołowska, prof. IBPRS

Warszawa, dn. 30.06.2023

Zakład Mikrobiologii

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego

im. prof. Wacława Dąbrowskiego - PIB

ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Justyna Nasiłowska, Barbara Sokołowska, Monika Fonberg-Broczek, 2019, **Behavior of *Listeria innocua* strains under pressure treatment – in-activation and sublethal injury**, Pol. J. Food Nutr. Sci., 69(1), 45–52, mój wkład w powstanie pracy polegał na pełnieniu funkcji promotora pracy doktorskiej, wsparciu merytorycznym oraz współudziale przy planowaniu badań i przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 10%.



dr Monika Fonberg-Broczek

Warszawa, dn. 02.03.2023

Instytut Wysokich Ciśnień PAN

ul. Sokołowska 29/37, 01-142 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Justyna Nasiłowska, Barbara Sokołowska, Monika Fonberg-Broczek, 2019, **Behavior of *Listeria innocua* strains under pressure treatment – in-activation and sublethal injury**, Pol. J. Food Nutr. Sci., 69(1), 45–52, mój wkład w powstanie pracy polegał na udostępnieniu aparatury do wykonania doświadczeń związanych z wykorzystaniem wysokiego ciśnienia hydrostatycznego. Mój udział procentowy szacuję na 5%.

M. Fonberg-Broczek

Publikacja 4

Nasiłowska J., Kocot A., Osuchowska P. N., Sokołowska B. (2021)
High-pressure-induced sublethal injuries of food pathogens—microscopic
assessment. *Foods*, 10(12)

Article

High-Pressure-Induced Sublethal Injuries of Food Pathogens—Microscopic Assessment

Justyna Nasilowska^{1,*}, Aleksandra Kocot², Paulina Natalia Osuchowska³ and Barbara Sokołowska^{1,4}

¹ Wacław Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology—State Research Institute, 01-142 Warsaw, Poland; barbara.sokolowska@ibprs.pl

² Department of Immunology and Food Microbiology, Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences, 10-748 Olsztyn, Poland; a.kocot@pan.olsztyn.pl

³ Biomedical Engineering Centre, Institute of Optoelectronics, Military University of Technology, 01-142 Warsaw, Poland; paulina.osuchowska@wat.edu.pl

⁴ Institute of High Pressure Physics, Polish Academy of Sciences, Laboratory of Biological Materials, 29/37 Sokołowska str., 01-142 Warsaw, Poland

* Correspondence: justyna.nasilowska@ibprs.pl; Tel.: +48-22-606-37-49

Abstract: High Hydrostatic Pressure (HHP) technology is considered an alternative method of food preservation. Nevertheless, the current dogma is that HHP might be insufficient to preserve food lastingly against some pathogens. Incompletely damaged cells can resuscitate under favorable conditions, and they may proliferate in food during storage. This study was undertaken to characterize the extent of sublethal injuries induced by HHP (300–500 MPa) on *Escherichia coli* and *Listeria innocua* strains. The morphological changes were evaluated using microscopy methods such as Scanning Electron Microscopy (SEM), Transmission Electron Microscopy (TEM), and Epifluorescence Microscopy (EFM). The overall assessment of the physiological state of tested bacteria through TEM and SEM showed that the action of pressure on the structure of the bacterial membrane was almost minor or unnoticeable, beyond the *L. innocua* wild-type strain. However, alterations were observed in subcellular structures such as the cytoplasm and nucleoid for both *L. innocua* and *E. coli* strains. More significant changes after the HHP of internal structures were reported in the case of wild-type strains isolated from raw juice. Extreme condensation of the cytoplasm was observed, while the outline of cells was intact. The percentage ratio between alive and injured cells in the population was assessed by fluorescent microscopy. The results of HHP-treated samples showed a heterogeneous population, and red cell aggregates were observed. The percentage ratio of live and dead cells (L/D) in the *L. innocua* collection strain population was higher than in the case of the wild-type strain (69%/31% and 55%/45%, respectively). In turn, *E. coli* populations were characterized with a similar L/D ratio. Half of the cells in the populations were distinguished as visibly fluorescing red. The results obtained in this study confirmed sublethal HHP reaction on pathogens cells.

Keywords: HHP; foodborne pathogens; SEM; TEM; EFM



Citation: Nasilowska, J.; Kocot, A.; Osuchowska, P.N.; Sokołowska, B. High-Pressure-Induced Sublethal Injuries of Food Pathogens—Microscopic Assessment. *Foods* **2021**, *10*, 2940. <https://doi.org/10.3390/foods10122940>

Academic Editor: Marek Kieliszek

Received: 25 October 2021

Accepted: 23 November 2021

Published: 30 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

In recent years, the development of microscopic methods has revolutionized the world of science. Microscopic techniques have started to be used for bacterial observation as a complement to scientific research and conventional diagnostic tests [1]. Nowadays, they are applied in the areas of clinical pathology, food, and water quality, where biological detection and quantification are significantly important [2,3]. Moreover, they are widely used to analyze the physiological state of microorganisms involved in biotechnological processes carried out on an industrial scale, where stress factors often appear [4]. Stress factors interfere with the growth and proper metabolism of bacteria, which causes a decrease in vitality and the inhibition of metabolic pathways [5]. The routine detection performed by counting CFU [colony forming unit] started to be replaced by instrumental techniques,

such as microscopy, flow cytometry, optical methods, and bioluminescence [3]. In the world of biological science, Electron Microscopy (EM) has played the key role. The rapid improvement of EM has enabled advances in research into cell morphology and has provided detailed structural information and cell components such as membranes, genomes, and ribosomes. Until recently, it was believed that the bacterial cell is an amorphous structure composed of various macroparticles [6]. EM has demonstrated that the bacterial cell has a precisely defined organization. The enlargement of the limit of resolution in EM has allowed one to observe bacteria in detail. EM demonstrated that bacteria have a cytoskeletal structure with a circular nucleoid with no nuclear envelope [7]. Moreover, EM provides information on topography, morphology, including pathological alterations of the ultrastructure, and composition of the sample. The first images of bacteria were published after the transmission electron microscope (TEM) was introduced. SEM offers the possibility to inspect the cell surface and confirm morphological damage to the cell wall [8]. In turn, TEM gives opportunities to visualize the cellular ultrastructure, which is crucial in understanding of how cells and tissues function in both normal physiological and pathological states. In addition, in biological science, both of them are often used for identifying new bacteria and virulent strains, uncovering new species, the study of bacterial adhesion [8,9], performance the bacterial membrane injury test after high-pressure treatment [10,11], pulsed electric fields [12], and others treatments [13]. SEM is also compatible with immunolabeling techniques to label specific features on the surface of cells [8].

Epifluorescence microscopy (EFM) is another useful type of microscopy. It allows the assessment of the activity of numerous determinants of cellular activity, and not just the ability to multiply and grow on culture media [14,15]. EFM is commonly used in the study of the physiological state of bacterial cells. Various parameters of the physiological state of bacterial cells can be labeled, depending on the used indicators [16]. These indicators are fluorescent dyes, known as fluorochromes or fluorophores [17]. Various types of fluorescent dyes are ascertained and inform about cell activity determinants such as membrane integrity, pump activity, membrane potential, or metabolic activity [18]. There are also commercial kits that contain selected dyes. These dyes allow the quick labeling and differentiation of cells in terms of selected parameters. An example of such a dye system is the Backlight LIVE/DEAD vitality kit (Termo Fisher Scientific, Walham, MA, USA). The abovementioned kit contains two dyes—Syt[®] 9 (Termo Fisher Scientific, Walham, MA, USA) and propidium iodide (PI) (Termo Fisher Scientific, Walham, MA, USA). Both dyes are markers of nucleic acids; however, they have a different molecular weight. They differentiate cells into living or dead cells, based on the intact or damaged cytoplasmic membranes. The Syt[®] 9 has a low molecular weight and penetrates both living and dead cells, emitting green fluorescence. On the other hand, PI has a high molecular weight and penetrates cells only with damaged cytoplasmic membranes, giving red fluorescence [19]. Hence, in the microscopic image, green and red cells can be observed, corresponding to living and dead cells, respectively. Previous studies have shown the effectiveness of fluorescent staining combined with microscopic analysis (EFM). They can be noticed in assessing the physiological condition of bacterial cells, subjected to stress conditions, such as osmotic stress [20], heat stress [21], the use of disinfectants [22], or high pressures [23].

Microscopic analytical methods might be important especially for testing new alternative preservation treatments, such as High Hydrostatic Pressure (HHP). HHP has become a widely used way of food preservation in many countries in the world. Nowadays, it belongs to the group of leading innovative technologies, which guarantee food assets desired by consumers [24–28]. Food and nutrition scientists have shown that HHP preservation brings various benefits regarding food quality and safety. HHP maintains physical–chemical food properties that guarantee flavor, color, and product composition [29–32]. Moreover, it provides high microbiological safety, such as thermal sterilization [33–35]. Despite the above benefits, HHP technology is still the subject of research interest, especially for microbiologists. HHP can result not only in the significant inactivation of microorganisms, but also induces a wide range of sublethal injuries in the cell population [36,37]. The

magnitude of these phenomena may be diverse depending on the genus or even species of microorganism. Additionally, the range of injuries depends on both the physiological condition of the bacterial strain and pressure process parameters, as well as on the intrinsic properties of the preserved food [36,38]. It was determined that the most likely first target of pressure is cytoplasmic membranes. As a result, there is a loss of plasma integrity, deformation of the membrane structure, and disruption of ion exchange in the bacterial cell. Moreover, pressure may influence the spatial organization of the cell. It damages the genetic mechanism and leads to unfavorable biochemical reactions, changes in ribosome conformation [39–41]. HHP-sublethal injury incurs cell functional disorders, which may be transient or permanent. On the one hand, the sublethally injured cell is characterized by the reduction in growth rate or the inability of growth in standard laboratory media. On the other hand, adaptations of microorganisms to sublethal stress initiate a range of responsive strategies within the bacterial cells [42]. Cells remain alive but undetectable. Moreover, they can repair themselves and proliferate in foods under appropriate conditions. As a consequence, it can result in a potential hazard that endangers food safety [28,43]. Therefore, the existence of sublethal damage of bacterial cells is the key issue that may compromise the efficiency of food preservation technologies. Thus far, extensive research on the effectiveness of HHP on bacteria has already been carried out. However, detailed descriptions of the responses of HHP-sublethally injured bacteria have not been available until now [28,37,38]. Scientists have suggested that both cell injury and the tailing effect are some of the factors that should be elucidated for improving the efficiency of new technologies. Moreover, the role of cell structure, physiology, and gene regulation in microbial resistance to alternative preservation technologies should also be investigated [43].

This study aimed to focus on the detection of sublethal injuries of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* strains, triggered by HHP. For this purpose, various microscopy techniques were used. A detailed analysis of sublethal injuries cell-by-cell was carried out. The visualization of changes in cell morphology features was performed with electron microscopies—SEM and TEM. The second step of this work was to evaluate the physiological state, regarding the whole population using EFM and the LIVE/DEAD Bacterial Vitality Kit. This comprehensive approach enabled the evaluation of several parameters, which indicate sublethal injuries. The results correlation obtained with all methods was evaluated. Moreover, the abovementioned analysis was carried out to obtain a better understanding of the bacterial cells' response to mild HHP.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of Bacterial Suspensions and Culture Conditions

Listeria innocua (CIP80.11T) obtained from the Culture Collection of the Institute Pasteur (Paris, France), *Escherichia coli* (ATCC 7839) obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), and two wild isolates (wild-type strains) from unpasteurized commercial Polish beetroot juice *Listeria innocua* 23/13 and *Escherichia coli* 61/14, obtained from our own culture collection of the Department of Fruit and Vegetable Product Technology at IAFB (Warsaw, Poland), were used in this study. Each strain was stored before use in a Cryobank (temperature below $-27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$). A pure culture in the form of immobilized sterile beads was added to a tube containing 10 mL of Brain Heart Infusion (BHI) broth (BioMerieux, I'Etoile, France). Then, bacterial subcultures were incubated under static conditions at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h. To prepare the second subculture, each overnight culture was moved with a $10\text{ }\mu\text{L}$ loop on a Petri dish, using plate count analytical methods with appropriate agar, and incubated. For each kind of species, *E. coli* and *L. innocua* Tryptic Soy (TSA) agar (Biocar Diagnostics, Beauvais, France) or Tryptic Soy Yeast Extract (TSYE) agar (Biocar Diagnostics, Beauvais, France) were used, respectively. After that, grown colonies were moved from the plate by the $10\text{ }\mu\text{L}$ loop to 250 mL Erlenmeyer flasks containing 200 mL of the appropriate broth: Tryptic Soy Broth (TSB) (Biocar Diagnostics, Beauvais, France), or Tryptic Soy Broth with Yeast Extract (TSBYE) (Biocar Diagnostics, Beauvais, France), respectively. Subcultures were incubated under the same abovementioned con-

ditions until the time of obtaining the stationary phase. Consecutive subcultures were prepared by the addition of 10 mL of the previously mentioned subculture into fresh 200 mL broth. Finally, 200 mL aliquots were taken from the cultures and centrifuged ($4000\times g$, 10 min, 4 °C) (Rotina 380R Hettich Instruments, Tuttlingen, Germany). Subsequently, supernatants were removed. The sedimented cells were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) and centrifuged one more time. The washing procedure was repeated threefold. Model suspensions of tested bacteria were prepared in PBS in 1:9 (*v/v*). The initial concentration of inoculum was about 7 log CFU/mL.

2.2. HHP Device and Parameters

Tested samples were transferred into sterile polyethylene tubes (Sarstedt, Newton, MA, USA) in 13 mL portions in duplicate. Then, samples were exposed to high hydrostatic pressures using a U 4000/65 device (Unipress, Warsaw, Poland). The maximum volume of the treatment chamber was 0.95 L, and the maximum working pressure was 600 MPa. The HHP device worked in the range of temperatures from -10 °C to $+80$ °C. The pressure-transmitting fluid that was used was distilled water and polypropylene glycol (1:1, *v/v*). The time needed to obtain the pressure up to 400 MPa was about 75 s. The release time was 2–4 s. Due to the adiabatic heating, the temperature increased approximately 3 °C per 400 MPa. The pressurization times reported did not include the come-up and come-down times. Samples were subjected to HHP at two variants of parameters: 400 MPa/5 min for *L. innocua* strains and 500 MPa/5 min for *E. coli* strains, at an ambient temperature (i.e., approximately 20 °C). The choice of process parameters for this study was deliberate. The main aim of this study was the detection of sublethal injuries. Thus, we chose the optimal pressure and time duration, based on our previous studies, to induce sublethal injuries of tested strains and not to inactivate them. For instance, our previous data showed that a pressure application of 400 MPa up to 10 min did not trigger significant injuries on both tested *E. coli* strains, while *L. innocua* strains were not detected. Both results were obtained with plate count analytical methods. The experiment in this study was performed twice with two independent repetitions for each trial ($n = 4$). Unpressurized samples were used as a control. After exposure to pressure, samples were analyzed with the usage of microscopic methods.

2.3. Scanning Electron Microscope Protocol (SEM)

To visualize bacterial morphology, the 10^7 CFU/mL density suspension of bacteria was filtered through 0.22 µm PVDF membrane filters (Isopore™, Millipore, Ireland). After that, bacteria on the membrane were fixed with 4% paraformaldehyde (MerckMillipore, Burlington, MA, USA) and 2% glutaraldehyde (MerckMillipore, Burlington, MA, USA) in PBS at 4 °C overnight. Thereafter, bacteria were washed three times with distilled water and incubated in 1% osmium tetroxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 4 °C for 16 h. The specimens were dehydrated in consecutively increasing concentrations of ethanol (30, 50, 70, 90, 96, and 99%) and acetone (30%, 50%, and 100%). Bacteria on the filter were dried in a critical point dryer (Leica EM CPD 300, Wetzlar, Germany) and were then coated with platinum using a sputter coater (Leica EM ACE200, Wetzmar, Germany). The morphology of bacteria was analyzed using a scanning electron microscope STEM (Quanta FEG450, FEI, OR, USA) at 10 kV (spot 3.5) in a high vacuum mode with an Everhart–Thornley Detector (ETD).

2.4. Transmission Electron Microscopy Protocol (TEM)

Tested samples were fixed with 2.5% glutaraldehyde cacodylic buffer and incubated for 1 h. After that, samples were washed with 0.1 M of cacodylic buffer. The next step was to postfix the samples in 1% OsO₄ in ddH₂O for 1 h and wash them three times in ddH₂O. After postfixation, the samples were dehydrated through a graded series of EtOH (30%—10 min, 50%—10 min, 70%—24 h, 80%—10 min, 90%—10 min, 96%—10 min, anhydrous EtOH—10 min, acetone—10 min). After that, they were infiltrated with Epon resin

in acetone (1:3—30 min, 1:1—30 min, 3:1—2 h). Moreover, they were infused twice for 24 h in pure Epon resin and polymerized at 60 °C for 24 h. Next, 60 nm sections were prepared using a RMC ultramicrotome MT-X (RMC Boeckeler Instruments, Tucson, AZ, USA) and contrasted with uranyl acetate and lead citrate according to Reynolds (1963) [44]. Samples were examined on a LIBRA 120 electron microscope produced by Zeiss (Oberkochen, Germany). Finally, images were captured with the Slow Scan CCD camera (Proscan) using EsiVision Pro 3.2 software (Soft Imaging Systems GmbH, Münster, Germany). Measurements were performed using the analySIS[®] 3.0 image-analytical software (Soft Imaging Systems GmbH, Münster, Germany).

2.5. Epifluorescent Microscopy (EFM)

An amount of 1 mL of each sample was centrifuged, and the pellet was resuspended in 1 mL of sterile phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2). Each sample was stained with a Live/Dead BacLight[™] viability kit (Termo Fisher Scientific, Walham, MA, USA) according to the manufacturer's recommendations [45], and incubated at ambient temperature for 15 min in darkness. After incubation, samples were filtered so that the cells settled on the surface of the black polycarbonate filters (Ø 13 mm, 0.2 µm; Isopore[™], Millipore, Darmstadt, Germany). The filtration set consisted of polypropylene Millipore Swinnex[®] membrane filter holders (MerckMillipore, Burlington, MA, USA) and a sterile medical needle and syringe. The filters were placed on microscopic slides, allowed to air-dry, and covered by a coverslip with mounting oil (Termo Fisher Scientific, Walham, MA, USA). The microscopic analysis was performed with an epifluorescence microscope Nikon E800 (Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, The Netherlands). The set of filters for green and red fluorescence were used. For green fluorescence, the following were used: excitation filter 465–495 nm and emission filter 515–555 nm. For red fluorescence, the following were used: excitation filter 540–580 nm and emission filter 600–660 nm. All of them correspond to the colors emitted by the Syto[®] 9 and PI. Visualization was made with the photo collecting software Lucia G version 4.82 (Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic). Then, representative images were merged with the usage of Image J software. The calculation of the surface area of live and dead cells was made with the usage of QuPath software 3.0.3 version (GitHub, San Francisco, CA, USA).

2.6. Statistical Analysis

Statistical analysis of the results was performed by the two-way ANOVA statistical model with Tukey's test, using Statistica version 13 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA). The differences were considered significant at $p < 0.05$. A statistical comparison was made for the results, obtained for live and dead cells for *L. innocua* and *E. coli* strains separately.

3. Results and Discussion

3.1. *Escherichia coli* EMs Observations

The spatial organization of *E. coli* strains, collection, and wild-type strain, before and after HHP, is demonstrated by the TEM and SEM images in Figures 1 and 2, respectively. The micrographs of both untreated samples showed characteristic rod-shaped *E. coli* cells, single or dividing. Morphologically, *E. coli* has a double cell wall, with a thin inner wall of peptidoglycan and an outer wall of carbohydrates, proteins, and lipids. TEM and SEM images confirmed a clearly defined, intact cell membrane and cell wall with a rough surface. Cells contained centrally located genomes surrounded by the integrated cytoplasmic area and tightly packed ribosomes. The application of pressure resulted in morphological differences in the appearance of both tested strains. In some bacterial cells, a loss of the general cellular shape was spotted by SEM. Individual cells were collapsed or even gutted and were characterized with squeezed envelopes. However, there was no significant membrane damage observed. Internal structural cell changes were visualized by TEM. The compression of interior regions and the expansion of nucleoid regions were

observed in the whole population. This indicates an aggregation of cytoplasm in the amorphous region and disorganization of the genome area containing fibrillar regions. The abovementioned intracellular disruption was significantly more extensive in cells of the wild-type strains. Moreover, blank spaces in the cytoplasm were observed (Figure 2). A similar effect of the internal cell disruption of *E. coli* strains, visualized by TEM, was reported by Prieto-Calvo et al. [11]. Two strains, pathogenic *E. coli* VTEC O157:H7 and nonpathogenic *E. coli*, were treated by HHP for 5 min under 300 MPa and 600 MPa. The changes in the molecular composition occurred within the cytoplasm and genome area. However, contrary to these findings, we observed neither cellular enlargement nor winding shapes. The same ultrastructural modification profile of *E. coli* K-12TG1 induced by HHP (150 MPa, 250 MPa, and 350 MPa at 25 °C) was detected. The condensed nucleoids and aggregated proteins occurred in the whole population; however, the intensity of structural changes increased along with the extension of pressure [46]. Other scientists demonstrated that a pressure below 300 MPa had no impact on the spatial organization of *E. coli* ATCC 25922 cells. The cell, assessed by TEM, maintained a distinct membrane and cell wall. The most visible changes were noticed when the pressure increased to 500 MPa. The aggregation of cytoplasmic material, enlargement of electron-transparent ranges in the cell cytoplasm, and disruption of cell membrane appearance, including the breakdown of the peptidoglycan layer, occurred. After 30 min of pressure treatment, expanded nucleoid regions and compacted interior regions were observed, which correspond to our findings obtained after 5 min of treatment [47]. A similar phenomenon was observed under TEM for *Salmonella enterica* serovar Thompson. *Salmonella* was characterized with amorphous compacted regions, probably representing denatured cytoplasmic proteins after 250 MPa for 10 min. The increasing pressure up to 500 MPa resulted in extreme condensation of the cytoplasm, whereas the outline of the cells was intact [10]. Hsu et al. [48] investigated six strains of *E. coli* "Big Six" non-O157 STECs and five strains of *E. coli* O157:H7 in fresh strawberry puree under HHP. The results showed the rupture of cell structures for tested bacteria. SEM micrographs showed that pressurization at 350 MPa for 15 min contributed to the envelopes' damage and collapsed off the edge of *E. coli* cells. The extension of pressure up to 550 MPa resulted in the severe injury of bacterial cells. It is known that Gram-negative bacteria are more sensitive to pressure than Gram-positive cells are. However, variations in pressure resistance occur even among strains belonging to the same species [49]. In this study, we analyzed the response of Gram-negative bacteria to pressure treatment below 600 MPa in ambient temperature. In most instances of quoted data, the type of morphological changes of Gram-negative bacterial cells induced by pressure was similar. However, the extension of injuries depends on the strain, suspension medium, and device's technical parameters.

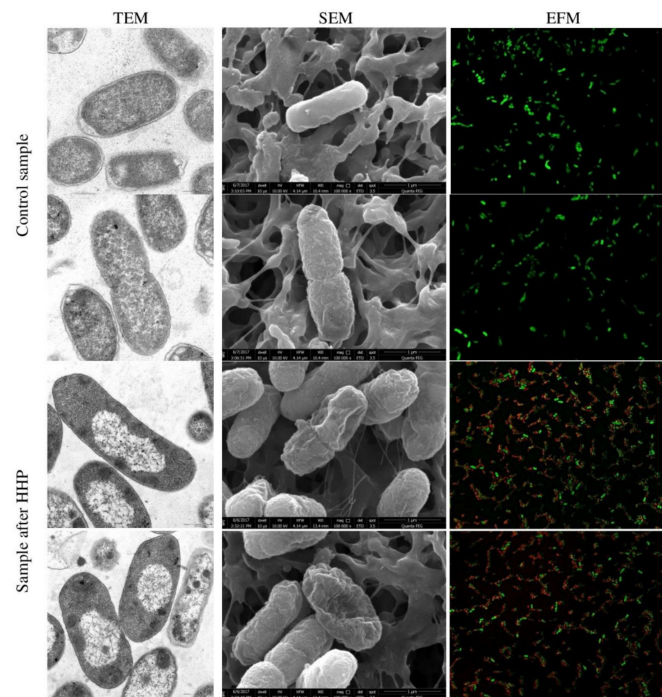


Figure 1. Representative images of *E. coli* ATCC 7839 before and after HHP treatment (500 MPa for 5 min). TEM micrographs scale bar, 0.5 μ m. SEM micrograph shows bacteria at 10,000 times magnification. Images were made at an accelerating voltage of 10.0 kV with the use of an ETD. Uptake of Syto[®] 9 (emission of green fluorescence) and PI (emission of red fluorescence) included in Live/Dead BacLight[™] viability kit visualized by EFM.

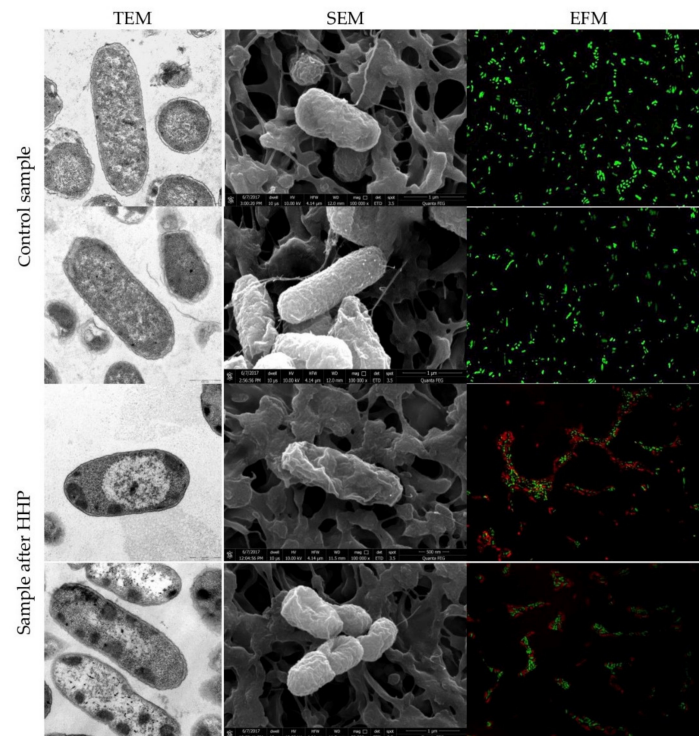


Figure 2. Representative images of *E. coli* 61/14 before and after HHP treatment (500 MPa for 5 min). TEM micrographs scale bar, 0.5 μ m. SEM micrograph shows bacteria at 10,000 times magnification. Images were made at an accelerating voltage of 10.0 kV with the use of an ETD. Uptake of Syto[®] 9 (emission of green fluorescence) and PI (emission of red fluorescence) included in Live/Dead BacLight[™] viability kit visualized by EFM.

3.2. *Listeria innocua* EMs Observations

TEM and SEM snapshots of both strains of *L. innocua*, before and after HHP, are presented in Figures 3 and 4, respectively. Morphologically, *Listeria* sp. has a thick cell wall made of peptidoglycan. Images of control samples showed the regular, rod-shaped cells with the continued, smooth, distinct cell membrane and uniform cell cytoplasm. The interior of the cells was properly organized with a centrally located genome and tightly packed ribosomes. Some cells were divided into both populations of *L. innocua*. Pressure application triggered minor and major changes in internal cell organization in both strains, visualized by TEM. The most notable changes were observed for the genome area. The significant disorganization of nucleic acid was confirmed. Contrary to *E. coli* strains, cytoplasm aggregation was reported not in the whole population, but exclusively for several cells of the tested *L. innocua* wild-type strain. Moreover, membrane permeabilization was also observed. In turn, the collection strain was characterized with an intact cell membrane. However, both *L. innocua* visualized by SEM were distorted and dilacerated. The deprivation of the membrane integrity revealed a discontinuous and distorted appearance and released its intracellular contents. Presumably, the disjunction between SEM and TEM visualization of the *L. innocua* collection strain could have been caused, not due to pressure, but probably because of sample preparation. Scientists claimed that the drying step is a common problem, especially for wet biological specimens [2]. Complementary observations by TEM in the spatial organization of *Listeria monocytogenes* NCTC 7973 suspended in TSB were reported by Mackey et al. [10]. Pressure application under 250 MPa at ambient temperature triggered significant changes. The interior of the cell was disrupted. Clear unusual symmetrical areas within the cytoplasm, which resembled gas bubbles, were spotted. Moreover, the cytoplasm was devoided by ribosomes. It was suggested that membrane invaginations might have been caused due to the osmotic effects or phase changes in the membrane [10]. In turn, exposure to a pressure of 500 MPa caused an increase in the number of cells with clear vacuolar regions, additionally containing fibrillar regions of DNA. Another study conducted by Huang et al. [49] with *Listeria monocytogenes* BCRC 15354 in milk was carried out with the usage of both electron microscopies, SEM and TEM. The results showed that after treatment with 450 MPa for 5 min, there were apparent damages visualized by SEM. The authors compared the alteration in the cell appearance to the cellular twist of cells. After HHP treatment, crushed and disintegrated cells were observed. Moreover, a progressive increase in the number of pimplelike lesions and swellings occurred. The results obtained through TEM also confirmed intracellular damages of *L. monocytogenes* cells. However, these changes appeared to be significantly different than those spotted in our experiment. The opposite phenomenon was achieved by Basaran-Akgul et al. [50] for a cocktail of three *L. innocua* strains visualized by SEM. Pressurization under 414 MPa and 517 MPa at 20 °C did not affect *L. innocua* cells. The same observations were confirmed by Ritz et al. [51]. They reported that the application of 400 MPa for 10 min did not disturb significantly membranes of *L. monocytogenes* CIP 103575 suspended in citrate buffer, visualized by SEM. Individual spotted changes were the bud scars on the cell surface. In the past couple years, different species and strains of *Listeria* sp., as a Gram-positive bacteria representative, were analyzed regarding the response to pressure treatment. The type of morphological changes differed among the *Listeria* genus in the mentioned publications. Although Gram-positive bacteria are known to be more resistant to pressure, the extent of triggered cell injuries may vary significantly. This phenomenon should be taken into account with the choice of pressure processing conditions, especially for products that carry a high risk of *Listeria* sp.

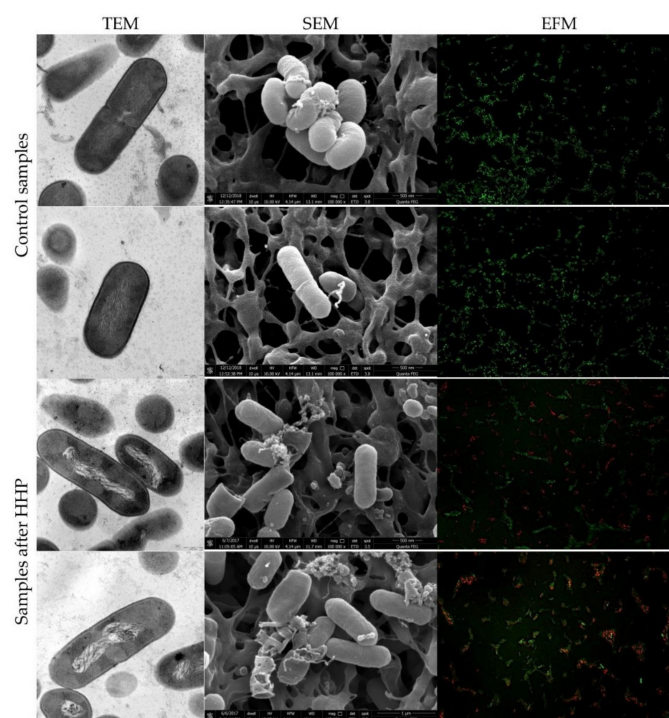


Figure 3. Representative images of *L. innocua* CIP80.11T before and after HHP treatment (400 MPa for 5 min). TEM micrographs scale bar, 0.5 μ m. SEM micrograph shows bacteria at 10,000 times magnification. Images were made at an accelerating voltage of 10.0 kV with the use of an ETD. Uptake of Syto[®] 9 (emission of green fluorescence) and PI (emission of red fluorescence) included in Live/Dead BacLight[™] viability kit visualized by EFM.

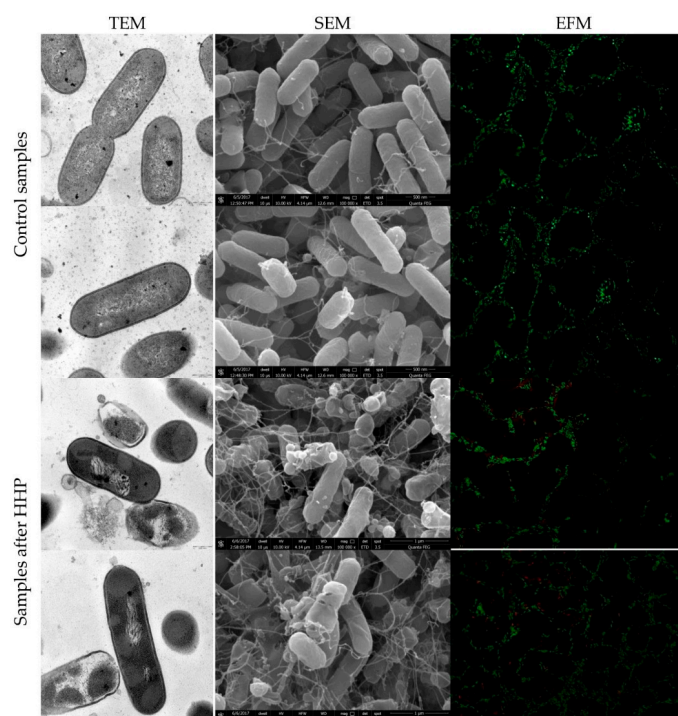


Figure 4. Representative images of *L. innocua* 23/13 before and after HHP treatment (400 MPa for 5 min). TEM micrographs scale bar, 0.5 μ m. SEM micrograph shows bacteria at 10,000 times magnification. Images were made at an accelerating voltage of 10.0 kV with the use of an ETD. Uptake of Syto[®] 9 (emission of green fluorescence) and PI (emission of red fluorescence) included in Live/Dead BacLight[™] viability kit visualized by EFM.

3.3. Physiological State of Cells Assessed by EFM

The physiological state observation of tested strains, evaluated by EFM, is shown in Figures 1–4. Images obtained for all control samples demonstrated homogeneous fluorescing green populations of cells (SYTO9-stained). That is the evidence for the cells' viability and their unaffected cell envelopes. As expected, cells occurred single-handedly, not in conglomerates. Staining HHP-treated samples showed a heterogeneous population. Both fluorescent green and fluorescent red cells were detected in all populations of tested strains. Opposite to control samples, cell aggregates were observed. The presence of red cell staining confirmed cell wall deterioration. Presumably, red cell aggregates represented a mixture of dead and injured cells. Due to the fact that cell conglomerates occurred, distinguishing single cells was impossible. Therefore, the calculation of the surface area of live and dead cells separately was carried out. The percentage ratio of live and dead (L/D) cells is shown in Figure 5. In the case of the *L. innocua*-tested strains, the L/D ratio was significantly higher for a collection strain ($p < 0.05$). There were 69% of viable cells and 31% of injured cells. In turn, the *L. innocua* wild-type strain characterized 55% and 45% of viable and injured cells, respectively. No significant differences between L/D ratios were reported for *E. coli* strains. There were around 40% and 60% of viable and injured cells in the populations, respectively. Prieto-Calvo et al. [11] analyzed the membrane integrity of two *E. coli* strains after the application of pressure (300 MPa and 600 MPa for 5 min) by EFM. They reported that the vast majority of HHP-treated cells were stained when exposed to PI, for both strains and both pressure levels. These results correspond to their TEM observations, in which the disruption and detachment of cellular envelopes were spotted. In turn, Huang et al. [49] examined cell membrane damages of *L. monocytogenes* BCRC 15354 after pressure application in a range from 250 MPa to 450 MPa. The increased uptake of PI corresponded to the increased value of pressure. In a sample treated with 450 MPa, the PI uptake increased 4.8 times in comparison with a control sample. Kimura et al. [52] detected injuries of *E. coli* ATCC25922 after HHP (400 MPa, 500 MPa, and 600 MPa after 5 min in 25 °C) by flow cytometry with the usage of set fluorescent dyes: propidium iodide and SYTO9. Just after pressure application, the profile of the population indicated only death and injured cells. However, the recovery of sublethally injured cells was perceived, after 24 and 48 h of incubation. The increase in cells in the living cell region emerged. Moreover, the PI/SYTO[®] 9 emission signal of the injured cells was stronger than that of dead cells. Additionally, they reported that the population of the living cells detected in FCM analysis mostly corresponded to the results obtained for the plate assay. The abovementioned observation is similar to our study. Ritz et al. [51] showed results obtained for *L. monocytogenes* CIP 103575 after HHP treatment (400 MPa). The membrane integrity of tested bacteria was investigated with a PI fluorochrome by flow cytometry. A heterogeneous population after staining was observed. As a consequence of high-pressure treatment, a significant portion of cells was injured, which suggests that their membranes were seriously damaged. In this experiment, we proved that HHP's effect on microbes is the appearance of internal structural damages. Although membrane permeabilization has been postulated as a major factor in the HHP-induced inactivation of microbes, the cell membrane of tested strains seems to remain intact beyond the *L. innocua* wild-type strain. Nevertheless, pressure triggered some physical damages. This was confirmed by EFM with staining analysis. PI can only enter cells via the membranes of injured or dead cells, which results in red fluorescence emission. Different types of staining analysis were performed in the abovementioned studies for the evaluation of the physiological state of HHP-injured bacteria. During this study, we tested the Backlight LIVE/DEAD vitality kit, as a quick method for injured cells. EFM analysis corresponds to observations obtained by TEM and SEM. Both the percentage ratio as well as the type and extent of morphological changes in the case of both *E. coli* strains were similar. In turn, the *L. innocua* wild-type strain, induced by pressure, was characterized with greater changes in internal cell organization than the *L. innocua* collection strain. It correlates with the results obtained by EFM, where the percentage of *Listeria* strain viable cells differed significantly.

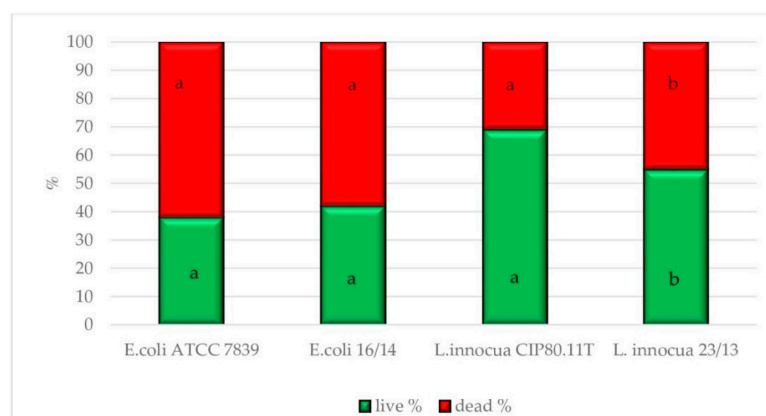


Figure 5. The percentage ratio of live and dead cells (with membrane permeabilization) after HHP process (*E. coli* strains—500 MPa/5 min and *L. innocua* strains—400 MPa/5 min). Results were calculated for 10 photographs of each strain. All experiments were performed twice. a, b values: live or dead cells denoted with the same letter are significantly different ($p < 0.05$).

4. Conclusions

The development of HHP technology has increased in recent years, and the extended diversity among food products has been reported. Nevertheless, this nonthermal treatment still has limitations. It has been demonstrated that changes in the cell morphology after pressure treatments were dependent upon the species [47], and the degree of damage may differ cell-by-cell [52]. To attain the quality and safety standards of high-pressure-processed foods, particular attention should be paid to the potential presence of sublethally injured cells. Research efforts have been made to clarify the relationship between sublethal injuries and products spoilage during long-term storage [53]. However, further studies are crucial to understanding the characteristics of HHP-injured bacteria and physiological changes of individual cells. The zone between lethal and sublethal injuries is probably a thin line. Moreover, the physiological state after treatment is commonly assessed only at the population level, while the presence of any subpopulation remains undetected. The microscopic approach enabled the analysis of both single cells and the whole population in terms of sublethal injuries. That mentioned above may support international standards in quality control laboratories.

Author Contributions: Conceptualization, J.N. and B.S.; methodology, J.N. and A.K.; formal analysis, J.N.; investigation, J.N., P.N.O.; data curation, J.N.; writing—original draft preparation, J.N. and A.K.; writing—review and editing, J.N., A.K. and B.S.; visualization, J.N. and P.N.O.; supervision, B.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available, due to privacy.

Acknowledgments: This work was supported by the Institute of High-Pressure Physics.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Gelderblom, H.R.; Hazelton, P.R. Specimen collection for electron microscopy. *Emerg. Infect. Dis.* **2000**, *6*, 433–434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Golding, C.G.; Lamboo, L.L.; Beniac, D.R.; Booth, T.F. The scanning electron microscope in microbiology and diagnosis of infectious disease. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 26516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Hameed, S.; Xie, L.; Ying, Y. Conventional and emerging detection techniques for pathogenic bacteria in food science: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, *81*, 61–73. [[CrossRef](#)]

4. Perfumo, A.; Elsaesser, A.; Littmann, S.; Foste, R.A.; Kuypers, M.M.M.; Cockell, C.S.; Kminek, G. Epifluorescence, SEM, TEM and nanoSIMS image analysis of the cold phenotype of *Clostridium psychrophilum* at subzero temperatures. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2014**, *90*, 869–882. [[CrossRef](#)]
5. Ruiz, L.; Aertsen, A.; Nguyen-The, C.; Gänzle, M.G.; Alvarez-Ordóñez, A. Editorial: Industrial and Host Associated Stress Responses in Food Microbes. Implications for Food Technology and Food Safety. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1522. [[CrossRef](#)]
6. Donczew, M.; Ginda, K.; Zakrzewska-Czerwińska, J.; Jakimowicz, D. Solving the mysteries of the bacterial cell—Application of novel techniques in fluorescence microscopy. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **2011**, *65*, 114–123. [[CrossRef](#)]
7. Bergmans, L.; Moisiadis, P.; Van Meerbeek, B.; Quiryneen, M.; Lambrechts, P. Microscopic observation of bacteria: Review highlighting the use of environmental SEM. *Int. Endod. J.* **2005**, *38*, 775–788. [[CrossRef](#)]
8. Grin, I.; Schwarz, H.; Linkeet, D. Electron microscopy techniques to study bacterial adhesion. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2011**, *715*, 257–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. González-Machado, C.; Capita, R.; Riesco-Peláez, F.; Alonso-Calleja, C. Visualization and quantification of the cellular and extracellular components of *Salmonella Agona* biofilms at different stages of development. *PLoS ONE* **2018**, *3*, e0200011. [[CrossRef](#)]
10. Mackey, B.M.; Forestière, K.; Issaacs, N.S.; Stenning, R.; Brooker, B. The effect of high hydrostatic pressure on *Salmonella thompson* and *Listeria monocytogenes* examined by electron microscopy. *Lett. Appl. Microbiol.* **1994**, *19*, 429–432. [[CrossRef](#)]
11. Prieto-Calvo, M.; Prieto, M.; Lopez, M.; Alvarez-Ordóñez, A. Effects of high hydrostatic pressure on *Escherichia coli* ultrastructure, membrane integrity and molecular composition as assessed by FTIR spectroscopy and microscopic imaging techniques. *Molecules* **2014**, *19*, 21310–21323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Pillet, F.; Formosa-Dague, C.; Baaziz, H.; Dague, E.; Rols, M.P. Cell wall as a target for bacteria inactivation by pulsed electric fields. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19778. [[CrossRef](#)]
13. Khadi, N.; Raj Upreti, A.; Li, Y. Simultaneous bacterial inactivation and degradation of an emerging pollutant under visible light by ZnFe₂O₄ co-modified with Ag and rGO. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 27007–27016. [[CrossRef](#)]
14. Berney, M.; Hammes, F.; Bosshard, F.; Weilenmann, H.U.; Egli, T. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 3283–3290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Stewart, E.J. Growing unculturable bacteria. *J. Bacteriol.* **2012**, *194*, 4151–4160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Dos Santos Leandro, E.; Kunrath Lima, G.; Fernandes de Carvalho, A.; Gomes Pereira, O.; de Moraes, C.A. Flow cytometric assessment of *Lactococcus lactis* isolates viability after lyophilization. *Int. J. Nutr. Food Sci.* **2014**, *5*, 391–396. [[CrossRef](#)]
17. Nishi, K.; Isobe, S.; Zhu, Y.; Kiyama, R. Fluorescence-based bioassays for the detection and evaluation of food materials. *Sensors* **2015**, *15*, 25831–25867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Léonard, L.; Bouarab Chibane, L.; Ouled Bouhedda, B.; Degraeve, P.; Oulahal, N. Recent Advances on Multi-Parameter Flow Cytometry to Characterize Antimicrobial Treatments. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1225. [[CrossRef](#)]
19. Moreno, Y.; Collado, M.C.; Ferrus, M.A.; Cobo, J.M.; Hernandez, E.; Hernandez, M. Viability assessment of lactic acid bacteria on commercial dairy products stored at 4 °C using LIVE/DEAD[®] BacLight[™] staining and conventional plate counts. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2006**, *41*, 275–280. [[CrossRef](#)]
20. Sunny-Roberts, E.O.; Knorr, D. Evaluation of the response of *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800 to sucrose-induced osmotic stress. *Food Microbiol.* **2008**, *25*, 183–189. [[CrossRef](#)]
21. Zotta, T.; Guidone, A.; Tremonte, P.; Parente, E.; Ricciardi, A. A comparison of fluorescent stains for the assessment of viability and metabolic activity of lactic acid bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *28*, 919–927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kocot, A.M.; Olszewska, M.A. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* with *Listeria innocua* in dual species biofilms and inactivation following disinfectant treatments. *LWT Food Sci. Technol.* **2020**, *118*, 108736. [[CrossRef](#)]
23. Nikparvar, B.; Subires, A.; Capellas, M.; Hernandez-Herrero, M.; Crauwels, P.; Riedel, C.U.; Bar, N. A diffusion model to quantify membrane repair process in *Listeria monocytogenes* exposed to high pressure processing based on fluorescence microscopy. *Data Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 598739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Huang, H.-W.; Lung, H.-M.; Yang, B.B.; Wang, C.-Y. Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing. *Food Control* **2014**, *40*, 250–259. [[CrossRef](#)]
25. Balasubramaniam, V.M.; Barbosa-Cánovas, G.V.; Lelieved, H.L.M. High Pressure Processing of Foods. *Food Sci. Technol. Int.* **2016**, *14*, 413–418. [[CrossRef](#)]
26. Huang, H.-W.; Wu, S.-J.; Lu, J.-K.; Shyu, Y.-T.; Wang, C.-Y. Current status and future trends of high-pressure processing in food industry. *Food Control* **2017**, *72*, 1–8. [[CrossRef](#)]
27. Cacace, F.; Bottani, E.; Rizzi, A.; Vignali, G. Evaluation of the economic and environmental sustainability of high pressure processing of foods. *Innovative. Food Sci. Emerg. Technol.* **2020**, *60*, 102281. [[CrossRef](#)]
28. Wu, D.; Forghani, F.; Banan-Mwine Daliri, E.; Li, J.; Liao, X.; Liu, D.; Ye, X.; Chen, S.; Ding, T. Microbial response to some nonthermal physical technologies. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *95*, 107–117. [[CrossRef](#)]
29. Torress Bello, E.F.; González Martínez, G.; Klotz Ceberio, B.F.; Rodrigo, D.; Martínez López, A. High Pressure Treatment in Foods. *Foods* **2014**, *3*, 476–490. [[CrossRef](#)]
30. Marszałek, K.; Woźniak, L.; Kruszewski, B.; Skapska, S. The effect of high pressure techniques on the stability of anthocyanins in fruit and vegetables. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Szczepańska, J.; Barba, F.J.; Skapska, S.; Marszałek, K. High pressure processing of carrot juice: Effect of static and multi-pulsed pressure on the polyphenolic profile, oxidoreductases activity and colour. *Food Chem.* **2020**, *307*, 125549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Balakrishna, A.K.; Wazed, M.A.; Farid, M.A. Review on the Effect of High Pressure Processing (HPP) on Gelatinization and Infusion of Nutrients. *Molecules* **2020**, *25*, 2369. [CrossRef]
33. Mukhopadhyay, S.; Sokorai, K.; Ukuku, D.; Fan, X.; Juneja, V.; Sites, J.; Cassidy, J. Inactivation of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in cantaloupe puree by high hydrostatic pressure with/without added ascorbic acid. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *235*, 77–84. [CrossRef] [PubMed]
34. Nasiłowska, J.; Sokołowska, B.; Fonberg-Broczek, M. Behavior of *Listeria innocua* strains under pressure treatment—Inactivation and sublethal injury. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2019**, *69*, 45–52. [CrossRef]
35. Sokołowska, B.; Nasiłowska, J.; Rutkowska, M.; Fonberg-Broczek, M.; Rzoska, S.J. The usage of high hydrostatic pressure (HHP) to control food-borne pathogens in hummus. *High Press. Res.* **2019**, *39*, 525–532. [CrossRef]
36. Yamamoto, K.; Zhang, X.; Inaoka, T.; Morimatsu, K.; Kimura, K.; Nakaura, Y. Bacterial Injury Induced by High Hydrostatic Pressure. *Food Eng. Rev.* **2021**, *13*, 442–453. [CrossRef]
37. Wesche, A.M.; Gurtler, J.B.; Marks, B.P.; Ryser, E.T. Stress, sublethal injury, resuscitation and virulence of bacterial foodborn pathogens. *J. Food Prot.* **2009**, *72*, 1121–1138. [CrossRef]
38. Podolak, R.; Whitman, D.; Black, A.G. Factors Affecting Microbial Inactivation during High Pressure Processing in Juices and Beverages: A Review. *J. Food Prot.* **2020**, *83*, 1561–1575. [CrossRef]
39. Hoover, D.G.; Metrick, C.; Papineau, A.M.; Farkas, D.F.; Knorr, D. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Tech.* **1989**, *43*, 99–107.
40. Yuste, J.; Capellas, M.; Fung, D.Y.C.; Mor-Mur, M. Inactivation and sublethal injury of foodborne pathogens by high pressure processing: Evaluation with conventional media and thin agar layer method. *Food Res. Int.* **2004**, *37*, 861–866. [CrossRef]
41. Maldonado, J.A.; Schaffner, D.W.; Cuitiño, A.M.; Karwe, M.V. In situ studies of microbial inactivation during high pressure processing. *High Pressure Res.* **2016**, *36*, 79–89. [CrossRef]
42. Pavlov, M.Y.; Ehrenberg, M. Optimal control of gene expression for fast proteome adaptation to environmental change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 20527–20532. [CrossRef]
43. Evrendilek, G.A. Microbial stress response to high pressure processing. In *Stress Response of Foodborne Microorganisms*; Wong, H.C.H., Ed.; Nova Science Publishers, Inc.: Hauppauge, NY, USA, 2012.
44. Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as electron-opaque stain for electron microscopy. *J. Cell Biol.* **1963**, *17*, 208–213. [CrossRef] [PubMed]
45. LIVE/DEAD®BacLight™ Bacterial Viability Kit Protocol. Available online: <https://www.thermofisher.com/pl/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/live-dead-baclight-bacterial-viability-protocol.html> (accessed on 17 October 2021).
46. Moussa, M.; Perrier-Cornet, J.-N.; Gervais, P. Damage in *Escherichia coli* Cells Treated with a Combination of High Hydrostatic Pressure and Subzero Temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 6508–6518. [CrossRef] [PubMed]
47. Yang, B.; Shi, Y.; Xia, X.; Xi, M.; Wang, X.; Ji, B.; Meng, J. Inactivation of foodborne pathogens in raw milk using high hydrostatic pressure. *Food Control* **2012**, *28*, 273–278. [CrossRef]
48. Hsu, H.Y.; Sheen, S.; Sites, J.; Huang, L.; Wu, J.S. Effect of high pressure treatment on the survival of shiga toxin producing *Escherichia coli* in strawberry puree. *Food Microbiol.* **2014**, *40*, 25–30. [CrossRef]
49. Huang, H.W.; Lung, H.M.; Chang, Y.H.; Yang, B.B.; Wang, C.Y. Inactivation of pathogenic *Listeria monocytogenes* in raw milk by high hydrostatic pressure. *Foodborne Pathog. Dis.* **2015**, *12*, 139–144. [CrossRef] [PubMed]
50. Basaran-Akgul, N.; Rasco, B. High pressure processing inactivation of *Listeria innocua* in minced trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Food Process. Preserv.* **2010**, *34*, 191–206. [CrossRef]
51. Ritz, M.; Tholozan, J.L.; Federighi, M.; Pilet, M.F. Physiological damages of *Listeria monocytogenes* treated by high hydrostatic pressure. *Int. J. Food Microbiol.* **2002**, *15*, 47–53. [CrossRef]
52. Kimura, K.; Morimatsu, K.; Inaoka, T.; Yamamoto, K. Injury and recovery of *Escherichia coli* ATCC25922 cells treated by high hydrostatic pressure at 400–600 MPa. *J. Biosci. Bioeng.* **2017**, *123*, 698–706. [CrossRef]
53. Nasiłowska, J.; Sokołowska, B.; Fonberg-Broczek, M. Long-Term Storage of Vegetable Juices Treated by High Hydrostatic Pressure: Assurance of the Microbial Safety. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2*, 7389381. [CrossRef] [PubMed]

Warszawa, dn. 30.06.2023

dr Aleksandra Kocot
Uniwersytet Gdański
Wydział Biologii
Katedra Mikrobiologii
ul. Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk
tel: +48 692 295 176
e-mail: aleksandra.kocot@ug.edu.pl

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Justyna Nasiłowska, Aleksandra Kocot, Paulina Natalia Osuchowska, Barbara Sokołowska, 2021, **High-Pressure-Induced Sublethal Injuries of Food Pathogens—Microscopic Assessment**, *Foods*, 10(12), 2940, mój wkład w powstanie pracy polegał na wsparciu merytorycznym w zakresie mikroskopii epifluorescencyjnej i współudziale przy przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na **8%**.

A. M. KOCOT

mgr inż. Paulina Natalia Osuchowska
Centrum Inżynierii Biomedycznej
Instytut Optoelektroniki
Wojskowa Akademia Techniczna
ul. gen. Sylwestra Kaliskiego 2, 00-908 Warszawa

Warszawa, dn. 30.06.2023

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Justyna Nasiłowska, Aleksandra Kocot, Paulina Natalia Osuchowska, Barbara Sokołowska, 2021, **High-Pressure-Induced Sublethal Injuries of Food Pathogens—Microscopic Assessment**, *Foods*, 10(12), 2940, mój wkład w powstanie pracy polegał na wykonaniu analiz w elektronowym mikroskopie skaningowym (SEM) i wizualizacji mikrografii. Mój udział procentowy szacuję na 7%.

Paulina Osuchowska

dr hab. inż. Barbara Sokołowska, prof. IBPRS

Warszawa, dn. 30.06.2023

Zakład Mikrobiologii

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego

im. prof. Wacława Dąbrowskiego - PIB

ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Justyna Nasiłowska, Aleksandra Kocot, Paulina Natalia Osuchowska, Barbara Sokołowska, 2021, **High-Pressure-Induced Sublethal Injuries of Food Pathogens—Microscopic Assessment**, *Foods*, 10(12), 2940, mój wkład w powstanie pracy polegał na pełnieniu funkcji promotora pracy doktorskiej i wsparciu merytorycznym. Mój udział procentowy szacuję na 5%.

Barbara Sokołowska

Publikacja 5

Nasiłowska J.; Sokołowska B.; Fonberg-Broczek M. (2022)

Escherichia coli and *Listeria innocua* stability in carrot juice preserved by high hydrostatic pressure. *AIMS Agriculture and Food*, 7(3), 623-636



Research article

***Escherichia coli* and *Listeria innocua* stability in carrot juice preserved by high hydrostatic pressure**

Justyna Nasilowska^{1,2,*}, Barbara Sokolowska^{1,2} and Monika Fonberg-Broczek²

¹ Department of Microbiology, Prof. Waclaw Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology, 36 Rakowiecka Str., 02-532 Warsaw, Poland

² Laboratory of Biological Materials, Institute of High-Pressure Physics Polish Academy of Sciences, 29/37 Sokołowska Str., 01-142 Warsaw, Poland

* **Correspondence:** Email: justyna.nasilowska@ibprs.pl; Tel: +486063749.

Abstract: The effect of High Hydrostatic Pressure (HHP) on *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in carrot juice was evaluated just after pressurization and during refrigerated storage for 14 days. Samples were processed with different variants of pressure (300, 400, 500) and time (1 min, 5 min, and 10 min). The number of bacteria in the populations was analyzed using plating count methods. Required 5 log reduction was achieved only for *L. innocua* strains starting from 400 MPa for 5 min. *E. coli* strains displayed resistance to pressure, and the maximum reduction achieved was 2 log CFU/mL for the harshest process parameters. Sublethal injuries in the bacterial population were observed for all tested strains. According to two standardized ISO methods, selective conventional agars, TBX, and ALOA were used in the storage test. Additionally, the Thin Agar Layer (TAL) method was applied. In both used methods, the possibilities of recovery were provided. The regeneration was observed exclusively for *L. innocua* strains. The recovery of sublethally injured cells on ALOA and TAL did not differ statistically in every strain. In turn, results obtained for *E. coli* suggest that TBX may underestimate the number of HHP-injured bacteria.

Keywords: carrot juice; high hydrostatic pressure; microbial stability; refrigerated storage

1. Introduction

Consumers demand safe and natural products without additives such as preservatives and

humectants. Therefore, unpasteurized juices are becoming more and more popular among users however, their production poses a lot of challenges for both producers and stockists. Most freshly squeezed vegetable juices characterize by numerous bioactive substances, that provide health benefits and support the fight against many civilization diseases. Moreover, vegetable juice consumption prevents the deficiency of many micronutrients in the human body. The most popular and frequently used component in many juices is the carrot. Carrot juice contains a large concentration of carotenoids, vitamins C, E, B, and phenolic acids, such as p-coumarin and caffeic acid [1–3]. Regrettably, fresh vegetable juices are a reservoir of natural microflora reaching from 10^5 to 10^7 CFU/mL [6]. They may be a fomite of pathogenic microorganisms such as some serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, and the intestinal protozoan *Cryptosporidium* [4]. Therefore, are not recommended for consumers with reduced immunity systems. While due to the high amount of spoilage microorganisms, raw unpasteurized juices have limited market potential. The shelf life declared by the producers commonly does not exceed 72 hours, depending on the type of juice. Because of the abovementioned circumstances, food manufacturers were looking for new mild and athermal technologies that extend the shelf life without changing its sensory and nutritional properties. HHP technology complies with the above requirements. It has been widespread in the food industry worldwide and has found applications in numerous products [5–7]. Nowadays, it is widely used in the fruit and vegetable industry around the world. Moreover, HHP is recognized as a "clean label" because no preservatives or additives are required. Although the HHP method was designed to eliminate all undesired microbiota, high pressure may generate a heterogeneous population. The pressure acts on various cellular components and triggers changes in cell morphology [8,9]. Cells with different health statuses may subsist equally at the same time in the food matrix after preservation treatment, ranging from intact to dead, including sublethally injured fractions and subpopulations [10]. The reversible cell condition, determined as sublethal injury, may end variously. One possible option is that sublethally injured cells will recover and repair. However, there is also the other possibility when sublethal injuries result in cell death. The presence of injured microorganisms in food is a significant aspect, especially in the case of products preserved by nonthermal technologies. Moreover, the fact that cells possibly recover during storage may have a potential hazard in the food processing industry. The detection of the whole cells in the population, both sublethally injured and healthy ones are important for correct interpretations of achieved results in food quality and safety microbiological laboratories. Microbiological methods, which detect foodborne pathogens, should be appropriate for detecting normal and injured cells in the population. It was reported that sublethally injured bacterial cells have a lower ability to multiply, extend lag phase, and cannot form a colony under selective conditions [11]. Moreover, not all cells can adopt new conditions at the same time or to the same extent. Supposedly, the next subpopulation may be much more resistant to treatment. Therefore, they initiate resistance mechanisms, and the recovery time may be shortened [10]. Many of the approved methods used for the isolation and enumeration of microorganisms in foods (selective media) do not facilitate the resuscitation of injured microorganisms and, in consequence, defeat their detection. Those selective media such as TBX for *E. coli* and ALOA for *Listeria* sp. are recommended by International Organization for Standardization (ISO) and used in the routine analysis in quality control laboratories. The ideal method should provide for the occurrence of sublethally injured cells in a food sample, and admit estimating whole microorganisms with different health statuses [12]. Kang and Fung [13] have proposed a suitable agar method that meets the abovementioned criteria. The Thin Agar Layer method (TAL) consists of two-layer of the solid medium on a Petri dish (Figure 1). The first bottom

layer is an appropriate selective agar for the enumeration of the target microorganism. While the overhead layer is nonselective agar. The injured microorganisms are inoculated directly on nonselective agar. In the first few hours of incubation, injured cells are possible to repair on the nonselective medium. After that, selective agents diffuse through a nonselective agar and create a selective environment. Those previously regenerated cells interact with selective agents and produce a typical reaction while other microorganisms are inhibited. It has been confirmed that the TAL method enables resuscitation of heat, cold, acid injured microorganisms, such as *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, [13–17] *Campylobacter coli* [18] or *Vibrio parahaemolyticus* [19].

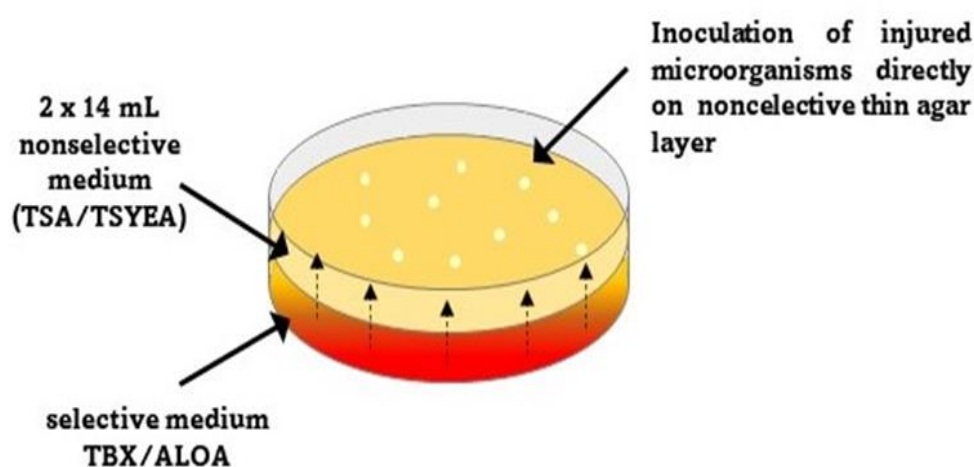


Figure 1. Thin Agar Layer (TAL) scheme.

Many quantitative studies on the high-pressure inactivation of microorganisms have been conducted only with the usage of a nonselective medium. Nonselective agars allow the growth of both non-injured and sublethally injured cells. However, they cannot differentiate target pathogens from a mixed population [12]. Additionally, there is still insufficient knowledge about the behavior of sublethally injured cells during storage in food matrices.

This study aimed to evaluate *E. coli* and *L. innocua* stability of pressurized carrot juice treated at 300, 400, and 500 MPa for three different pressure durations (1 min, 5 min, and 10 min) at ambient temperature. The second purpose of this research was to evaluate the possibilities of regeneration of HHP-sublethally injured cells on conventional selective mediums obligated for certificated laboratories and the usage of the TAL method.

2. Materials and methods

2.1. Tested microorganisms and inoculum culture

E. coli ATCC 7839 (obtained from American Type Culture Collection, Manassas, USA) and *L. innocua* CIP80.11T (obtained from the Culture Collection of the Institute Pasteur, Paris, France) were used in this investigation. Additionally, isolates from unpasteurized, commercial beetroot juice: *L. innocua* 23/13 and *E. coli* 61/14 (obtained from the Department's collection of Fruit and Vegetable Product Technology at IAFB, Warsaw, Poland), were chosen as wild-type strains. Firstly, strains were activated from Cryobanks stored at -27 ± 3 °C and grown overnight at 37 °C in 10 mL of sterile Brain Heart Infusion (BHI) broths (BioMerieux, l'Etoile, France). Next, cultures were moved with a 10 µL loop on a Petri dish, through streak plate technique with Tryptic Soy (TSA) agar (Biocar Diagnostics, Beauvais, France) for *E. coli* or Tryptic Soy Yeast Extract (TSYE) agar (Biocar Diagnostics, Beauvais, France) for *L. innocua*. Then the culture was added to 250 mL Erlenmeyer flasks containing 200 mL of Tryptic Soy Broth (TSB) (Biocar Diagnostics, Beauvais, France), or Tryptic Soy Broth with Yeast Extract (TSBYE) (Biocar Diagnostics, Beauvais, France) using 10 µL loops to prepare the second subculture. The next steps were as follows: incubation of cultures at 37 °C for 18 h; adding 10 mL of the second subculture to the fresh, sterile broth (TSB or TSYEB); incubation of them under the abovementioned conditions. The next process included: harvesting each strain by centrifugation at $4000 \times g$ for 10 min at 4 °C; washing them three times with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), and resuspending them in 10 mL of PBS. Shortly before HHP treatment, carrot juice (Vital Fresh, pH 6.0–6.7) was inoculated with bacterial suspensions in PBS (final concentration was approximately 7 log CFU/mL) and transferred into sterile polyethylene tubes (Sarstedt, Newton, USA) in 13 mL portions in duplicate.

2.2. HHP equipment and process parameters

Samples were pressurized using U 4000/65 device (Unipress, Warsaw, Poland). The detailed description of the HHP device was as follows: maximum volume of treatment chamber—0.95 L; maximum working pressure—600 MPa; working temperature from -10 °C to $+80$ °C; transmitting fluid—a mixture of distilled water and polypropylene glycol (1:1, v/v); the time needed to obtain the pressure up to 400 MPa—75 s; release time 2–4 s. Due to the adiabatic heating, the temperature increased approximately 3 °C per 400 MPa. Nine different combinations including time (1 min, 5 min, 10 min) and pressure (300 MPa, 400 MPa, 500 MPa) were used for any of the tested strains. The pressurization was carried out at temperatures in a range of 18 °C to 20 °C and reported times do not include the come-up and come-down times. Afterward, two sets of the HHP parameters were selected for further research concerning refrigerated storage as the sublethal high-pressure value: 400 MPa/5 min for *L. innocua* strains and 500 MPa/5 min for *E. coli* strains. Different HHP parameters for species were dictated by their different sensitivity to pressure. Samples were pressurized in two independent cycles.

2.3. Plate count methods

The number of bacterial survivals after HHP treatment was estimated using pure plate methods. The number of all viable cells of *E. coli* and *L. innocua* populations was estimated using nonselective agars, TSA, and TYEA, respectively. Simultaneously, the number of non-injured cells was analyzed

on the same agars, however, they were supplemented with 5% NaCl (w/v). It was a critical concentration of NaCl, that did not affect the number of tested strains [20]. Plates were incubated at 37 °C for 24 h or 48 h, and the results were expressed as a colony-forming unit (CFU)/mL. The number of sublethally injured cells was calculated according to the following equation:

$$\text{sublethal injury log number} = \text{LOG} \frac{\text{CFU nonselective}}{\text{CFU selective(5\%NaCl)}} \quad (1)$$

Equation 1. The number of sublethally injured cells log CFU/mL.

The number of bacterial cells suspended in carrot juice was enumerated at regular intervals during refrigerated storage. The surface-plated method on conventional selective media was used. The number of *E. coli* strains was estimated using TBX (BioRad, California, USA), according to the procedure included in ISO 16649-2 [21]. The number of *L. innocua* strains was estimated using ALOA (BioMerieux, l'Etoile, France) according to the procedure included in ISO 11290-2 [22]. Additionally, TAL methods were used, and plates were incubated at 37 °C up to 48 h.

2.4. Statistical analysis

Statistical analysis of the results was performed by two-way ANOVA statistical model with Tukey's test, using Statistica version 13 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA). The differences were considered significant at $p < 0.05$. Statistical comparison was made for results, obtained for strains of the same species.

3. Results

3.1. HHP impact on the vitality and sublethal injuries of *L. innocua* and *E. coli* suspended in carrot juice

Changes in the *E. coli* and *L. innocua* strains population suspended in carrot juice after HHP MPa up to 10 min. Significant changes ($p < 0.05$) were observed after pressure at 500 MPa for 10 min. The inactivation of the wild-type strain was about 2.0 log CFU/mL, but in the case of collection, the strain did not exceed 1.0 log CFU/mL. Results have shown that *L. innocua* strains were more sensitive to HHP than *E. coli*. After pressurization at 300 MPa, up to 10 min, the reduction for both *L. innocua* strains did not exceed 1.0 log CFU/mL. Above this pressure value changes in the cell number of *L. innocua* populations were observed. Pressurization at 400 MPa for 5 min decreased the number of *L. innocua* collection strains by 4.0 log CFU/mL. In turn, under these conditions inactivation of the wild-type *L. innocua* strain was about 2.8 log CFU/mL. Extending treatment time up to 10 min resulted in no growth of *L. innocua* collection strain. In turn, a further 3 log CFU/mL reduction was observed for the wild-type strain. Exposure to 500 MPa for 1 min reduced the number of collection and wild-type strains by 3.5 CFU/mL and 2.3 CFU/mL, respectively. Treatment time increase to 5 min resulted in an additional c.a. 2.5 log reduction for both *L. innocua* strains. The most rigorous parameters (500 MPa, 10 min) affected no *L. innocua* growth on the plate. The pressure and time both correlated positively with bacterial inactivation in carrot juice. The number of HHP-sublethal injured cells in the bacterial population is shown in Table 1. There were no significant changes in the number of sublethally injured cells within all populations after pressurization at 300 MPa up to 10 min. Pressurization at 400 MPa for 1 min prompted major injuries, exclusively in *L. innocua* collection strains ($p < 0.05$) in the amount

of 1.7 log CFU/mL. In the case of other strains, the number of sublethal injuries did not exceed 1.0 log CFU/mL. A similar effect was observed after 400 MPa for 5 min, however, the number of sublethally injured cells slightly increased for most strains. Extending treatment time to 10 min resulted in 1.0 log CFU/mL and 2.2 number of sublethal injuries in *E. coli* collection and wild-type strain population, respectively. The number of sublethally injured cells of the *L. innocua* wild-type strain was 0.4, whereas the as collection strain was not detected. Pressure at 500 MPa resulted in a significant increase in the level of *E. coli* cell damage which positively correlated with the extension of treatment time. After 5 and 10 min treatment, it was approximately 3.1–3.5 log CFU/mL and 5.5–4.3 log CFU/mL for collection and wild-type strain, respectively ($p < 0.05$) (Table 1). The application of 500 MPa for 1 min induced a similar level of sublethal injuries for *L. innocua* collection strain than after 400 MPa for 5 min. Appropriately 1.3 log CFU/mL and 1.2 log CFU/mL was obtained. The same HHP parameters did not significantly affect sublethal damages within the *L. innocua* wild-type strain population. The extension of treatment time did not increase the number of sublethally injured cells, neither collection nor wild-type strain of *L. innocua*. After 10 min treatment at 500 MPa, both *L. innocua* strains were below the detection level (1.0 log CFU/mL).

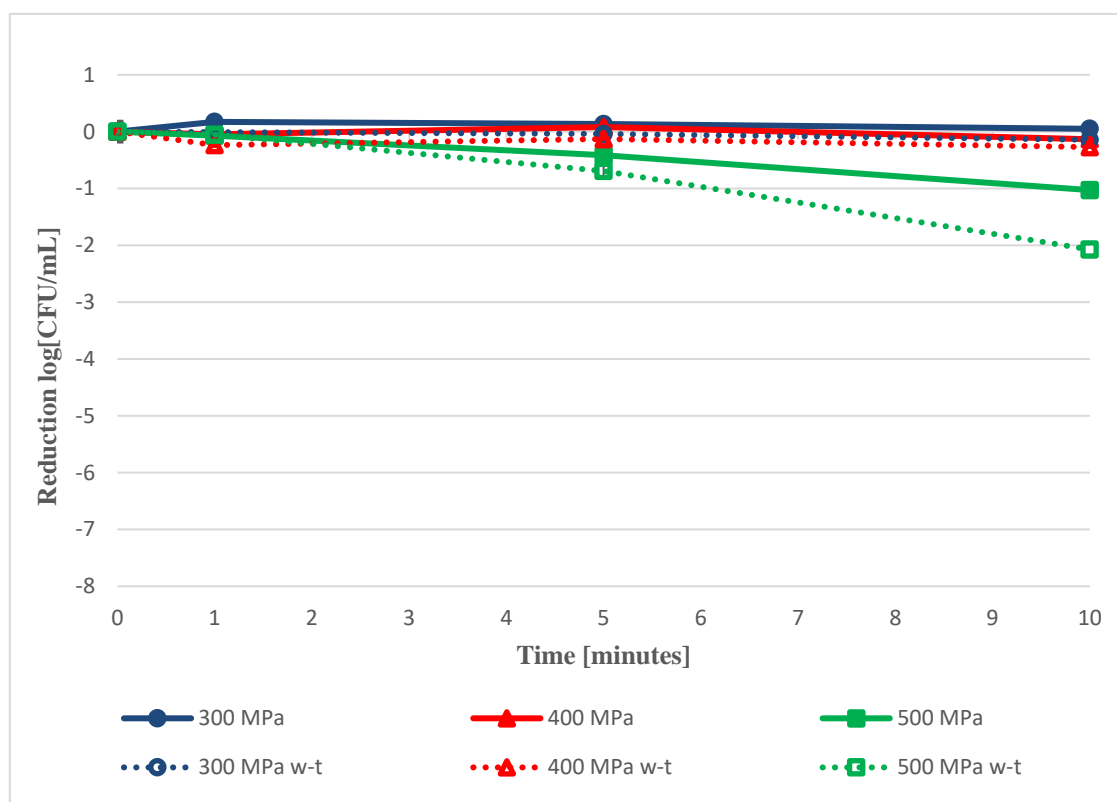


Figure 2. Reduction curves of HHP-treated *E. coli* strains suspended in carrot juice. Closed symbols and continued lines indicate *E. coli* ATCC 7839. Open symbols and dotted lines indicate the results obtained for *E. coli* 61/14 (wild-type).

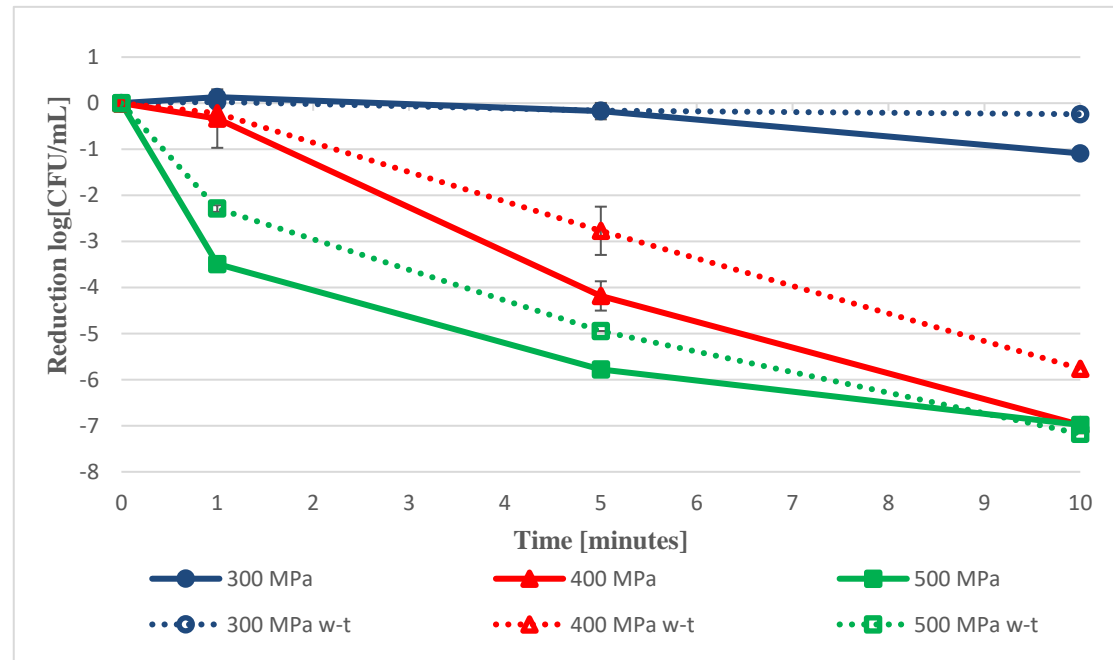


Figure 3. Reduction curves of HHP-treated *L. innocua* strains suspended in carrot juice. Closed symbols and continued lines indicate *L. innocua* CIP80.11T. Open symbols and dotted lines indicate the results obtained for *L. innocua* 23/13 (wild-type).

Table 1. The number of sublethally injured cells of bacterial population suspended in carrot juice.

Strains/parameters	HHP 300 MPa			HHP 400 MPa			HHP 500 MPa		
	1 min	5 min	10 min	1 min	5 min	10 min	1 min	5 min	10 min
<i>E. coli</i> ATCC 7839	0.15 ± 0.00 ^a	0.13 ± 0.00 ^a	0.17 ± 0.01 ^a	0.19 ± 0.04 ^a	0.47 ± 0.00 ^{ab}	1.01 ± 0.00 ^c	0.35 ± 0.02 ^{ab}	3.11 ± 0.18 ^e	5.50 ± 0.00 ^g
<i>E. coli</i> 61/14	0.17 ± 0.06 ^a	0.13 ± 0.01 ^a	0.05 ± 0.00 ^a	0.12 ± 0.03 ^a	0.70 ± 0.04 ^{bc}	2.15 ± 0.00 ^d	0.22 ± 0.11 ^a	3.46 ± 0.38 ^e	4.34 ± 0.00 ^f
<i>L. innocua</i> CIP80.11T	0.11 ± 0.00 ^{ab}	0.25 ± 0.16 ^{abcd}	0.14 ± 0.00 ^{abc}	1.68 ± 0.00 ^f	1.34 ± 0.30 ^{ef}	Nd ^a	1.24 ± 0.00 ^e	0.55 ± 0.00 ^d	Nd ^a
<i>L. innocua</i> 23/13	-0.01 ± 0.02 ^a	0.06 ± 0.04 ^a	0.05 ± 0.00 ^{ab}	0.23 ± 0.21 ^{abcd}	0.53 ± 0.00 ^{cd}	0.37 ± 0.30 ^{abcd}	0.36 ± 0.04 ^{abcd}	0.45 ± 0.00 ^{bcd}	Nd ^a

All data were the mean ± SD, n = 2. Values in rows (a–g) denoted with a different letter are significantly different at p < 0.05, obtained for strains of the same species. Nd: not detected.

3.2. The comparison of conventional selective media and TAL for regeneration of HHP-sublethally injured cells during refrigerated storage

The next aim of this study was to estimate the number of healthy and recovered cells obtained with two different culturing procedures: ISO recommendations and the TAL method. The second purpose was to compare which procedure enables better regeneration of sublethally injured cells. The growth of tested bacteria on conventional selective media, TBX and ALOA, in comparison to TAL, is shown in Figures 4 and 5. The cell number of the HHP-treated *E. coli* collection strain gradually decreased during cold storage. Finally, after 14 days of storage, the decrease was 2.5 log CFU/mL in reference to initial microbial counts, just after HHP treatment. In turn, the level of *E. coli* wild-type strain did not decrease below 6.0 log CFU/mL (Figure 4). Significant differences were observed between the growth of TBX and TAL. In most cases, the number of viable cells on TAL plates was higher than on TBX. The differences between the log CFU/mL of *E. coli* collection strain on TAL and TBX ranged from 0.05 to 0.88. Exclusively on the 14th day of storage, there was an opposite situation in which the recovery was better on TBX. The distinction between colony numbers of *E. coli* wild-type strain on both media ranged from 0.22 to 0.58 log CFU/mL. The number of *L. innocua* population in carrot juice increased during 2-week storage in reference to initial microbial counts (Figure 5). However, there were no significant changes between the results obtained on TAL and ALOA ($p \geq 0.05$). The growth of bacteria on both agars was comparable. The differences between the log CFU/mL on TAL and ALOA did not exceed 0.16 log CFU/mL. Exclusively on day 14th the distinction between colony numbers of *L. innocua* collection strain on TAL and ALOA was 0.71 log CFU/mL.

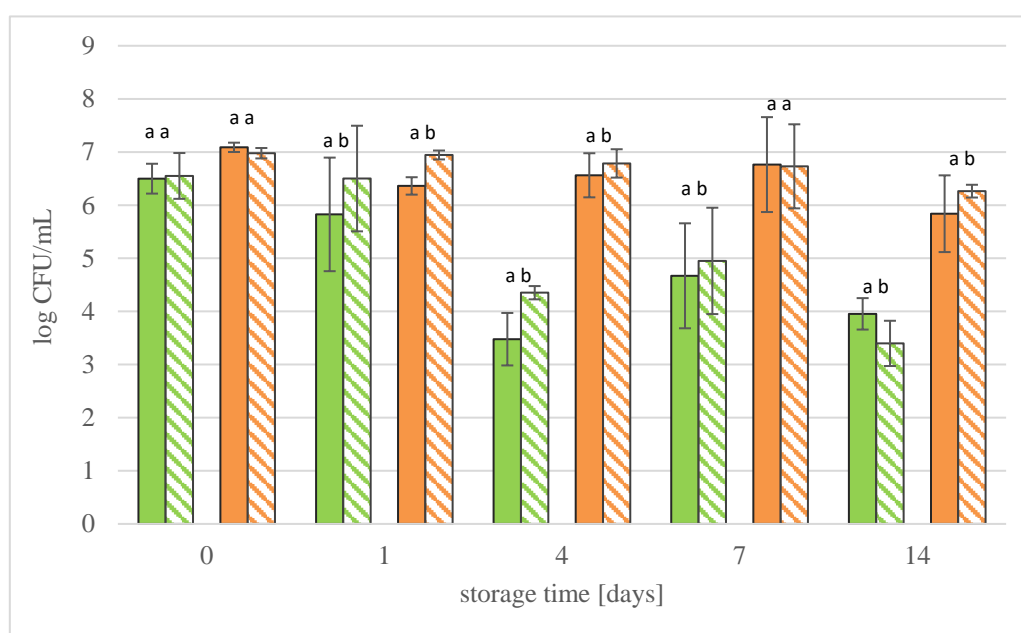


Figure 4. The growth of *E. coli* ATCC 7839, (■) 61/14 (■) in HHP treated (400 MPa/5 min) carrot juice stored at 5 °C for 14 days on different selective media: TBX (plain bars) and TAL (texture bars).

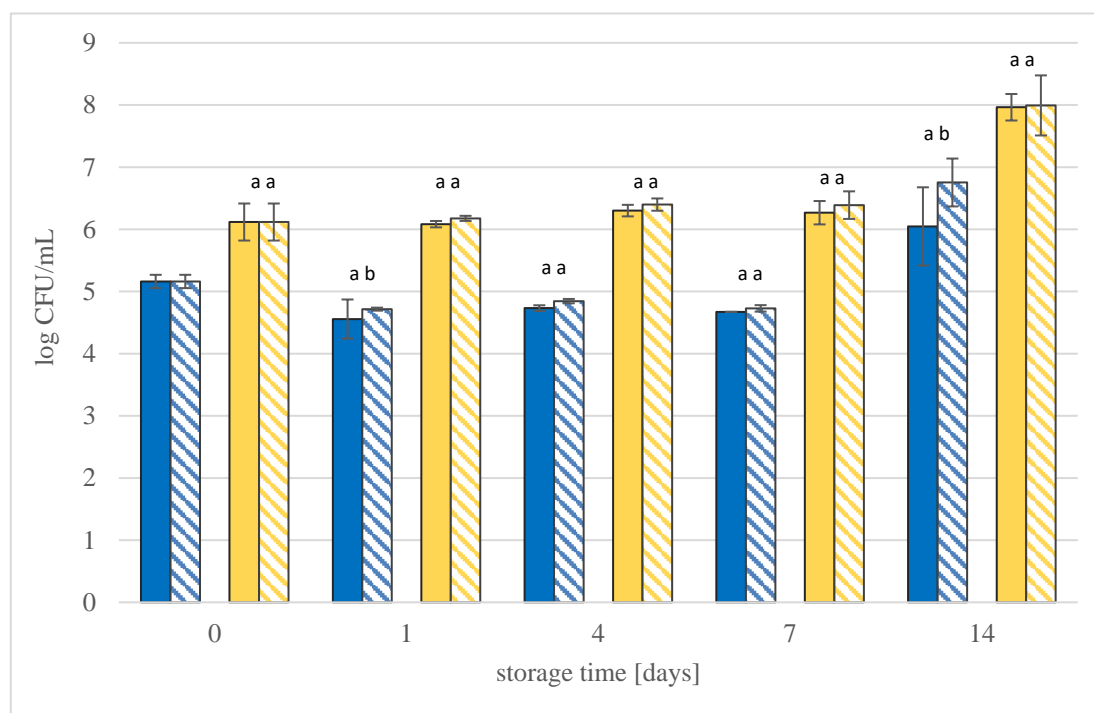


Figure 5. The growth of *L. innocua* CIP80.11T, (■) 23/13 (■) in HHP treated (400 MPa/5 min) carrot juice stored at 5 °C for 14 days on different selective media: ALOA (plain bars) and TAL (texture bars).

4. Discussion

4.1. HHP impact on the vitality and sublethal injuries of bacteria

Pokhrel et al. [23] described the effectiveness of HHP (200-500 MPa) on the inactivation of *L. innocua* ATCC 51742 and *E. coli* ATCC 11755 in thermally pasteurized carrot juice (pH 6.4). Similar to our results, pressurization up to 300 MPa was not effective in the inactivation of both microorganisms. Application of pressure at 500 MPa for 2 min resulted in a 4 log CFU/mL reduction of *L. innocua*, corresponding to our findings. However, opposite to our experiment, the 5 log CFU/mL reduction for *E. coli* was observed in these HHP conditions. In another study, Pokhrel et al. [24] showed that 400 MPa for 3 min decreased the number of *L. innocua* ATCC 51742 suspended in carrot-orange juice (pH 6.0) by over 6 log CFU/mL. Similar results were presented by Patterson et al. [25], in which numbers of *L. monocytogenes* decreased more than 6 log CFU/mL in carrot juice after pressurization at 500 MPa for 1 min. Opstal et al. [26] studied the inactivation kinetics of *E. coli* MG1655 in fresh carrot juice treated by HHP. They applied pressure in a range of 150–600 MPa at different temperatures (5–45 °C). They observed that inactivation kinetics was described by the first-order relationship, which means that all cells in the population have equivalent resistance to the lethal treatment. They reported that 8.6 min HHP treatment is required to achieve a decimal reduction of *E. coli* in carrot juice at 500 MPa at 20 °C and 15 min at 400 MPa. Resembling studies had been conducted by Pilavtepe-Çelik et al. [27]. Based on the 5 log reduction simulations, they suggested that carrot juice (pH 6.22) had a protective effect on *E. coli* O157:H7 933, treated by HHP at 300 MPa. This conclusion

corresponds to our achievements in which, it has been demonstrated that there is no reduction of *E. coli* in carrot juice just after HHP treatment at 300 MPa up to 10 min. Additionally, *L. innocua* turned out more sensitive to pressure than *E. coli*. However, our findings do not correspond with the general opinion that Gram-negative bacteria are more sensitive to physical stress than Gram-positive bacteria. Numerous studies confirmed that HHP triggers sublethal injuries of vegetative cells [28,29]. However, there is sparing data concerning this phenomenon in alkaline vegetable juices. The problem of sublethal injuries is minimized in acidic food matrices, while it occurs when the food matrices have a neutral pH. According to the food legislation in the USA, a 5 log CFU/mL reduction of "pertinent microorganisms" is sufficient to claim preservation treatment [30]. Full commercialization of HHP technology to low acid foods has been realized much later than to acidic products due to a lack of available scientific information concerning the process. Nowadays, according to Juice HACCP Hazards and Controls Guidance, low acid juices, such as carrot juice, need to be distributed under refrigeration [27]. Nevertheless, the sublethal injury phenomenon should be taken into account with the choice of HHP conditions, notably for products that carry a high risk of dangerous pathogens. Scientists suggest that survivability depends not only on the strain and the device's parameters. Food matrices have an impact on the result and exhibit either a protective or sensitizing effect on microorganisms [27].

4.2. The influence of culture media and long-term storage on the regeneration of HHP-sublethally injured bacterial cells

The study of pathogens injury induced by HHP and the effect of storage on their recovery has been reported by several groups of researchers [25,31–33], however, most of them are concerned with fruit juices. Carrot juice preserved by HHP has been well examined just after processing as well as during storage, but in the most of research total, natural microbiota has been investigated, not strictly pathogens. Patterson et al. [25] reported that the number of pressurized (500 MPa/1 min) *E. coli* cells in carrot juice decreased during refrigerated storage, whereas after 10 days, it was under detectable level. A similar observation has been made for a cocktail of *L. monocytogenes* under the same HHP conditions, while bacteria reached an undetectable level in 14 days of subsequent refrigerated storage. Contrary to the abovementioned studies, we observed propagation of *L. innocua* in pressurized (400 MPa, 5 min) carrot juice, stored at 5 °C for 2 weeks. This phenomenon was not observed for *E. coli*. The number of *E. coli* strains slowly decreased or was stable during refrigerated storage of carrot juice, referring to initial cell counts. Pokhrel et al. [23] carried out the shelf-life studies of freshly squeezed carrot juice. The total plate counts were about 1 log CFU/mL in carrot juice after HHP (500 MPa, 20 °C). The number of microorganisms increased up to 3 logs CFU/mL after 28 days of refrigerated storage. Szwajgier et al. [34] reported that pressurization at 500 MPa for 15 min at room temperature was insufficient to eliminate psychrotrophic bacteria in beet/carrot (80/20 v/v) juice. Despite juice pH being 4.0, the number of microorganisms increased by over 5.5 log CFU/mL after 3 weeks of refrigerated storage. There are numerous studies in which pressure treatment of low pH products and subsequent cold storage prevented the outgrowth and caused further inactivation of the sublethally injured vegetative cells [32,35,36]. However, in our investigation pH of carrot juice did not decrease below 6.0 during 14-days of refrigerated storage. It was measured at the same intervals as plate count analysis was made. There are numerous accessible research data relating to TAL application for the enumeration of pathogens preserved by physical and chemical treatments [13–18,37,38]. Those studies

confirmed that TAL allowed for improved isolation of single colonies for pure and mixed cultures. However, there are only a few data for the survivors' evaluation after HHP using TAL. Lavieri et al. [39] studied the recovery of pressured and heat-injured cultures of mixture *L. monocytogenes* in TSYEB. The obtained results demonstrated that the recovery of thermally injured cells was significantly better on TAL than on selective medium (MOX). This phenomenon was not observed for pressure-injured cells. It corresponds to our achievements for pressure-treated *L. innocua* strains. In turn, there was a significant difference between colony numbers of *E. coli* strains on TAL and TBX in our study. The abovementioned results demonstrated that selective media, used for microorganisms enumeration and detection, might not be suitable for the recovery of HHP-injured cells for all types of microorganisms. Selective media can underestimate its presence and be especially dangerous in the case of foodborne pathogens. The essential point of previously mentioned studies is that the TAL method has been used to recover injured cells after preservation treatment. Moreover, it provided typical colony morphologies of target pathogens and color reactions on the respective agars. However, there is no report of the TAL application in the storage investigation.

5. Conclusion

The results indicate the lethality of *L. innocua* bacteria in carrot juice after HHP treatment at ambient temperature. In turn, the application of 500 MPa for 10 min on *E. coli* strains did not meet the FDA's required inactivation criteria (>5-log CFU/mL reduction). Carrot juice is a complex matrix because of its non-acid environment. Hence, numerous studies confirmed that unsupported HHP treatment is unsuitable for carrot juice preservation and subsequent long-term storage. Only hurdle technology or combining procedures with other treatments or others additives may bring the expected effect. Second, a remarkable observation is that sublethally injured cells of *L. innocua* may resuscitate in carrot juice during cold storage. TAL effectively recovered bacteria injured by HHP. However, the effectiveness of the TAL method may be specific to the type of applied injury and species of microorganism. In conclusion, this study will contribute to collecting the data on the regeneration of HHP-sublethally injured cells on a conventional selective medium recommended by ISO versus TAL.

Acknowledgments

This work was supported by the Prof. Waław Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of the article.

References

1. Domagała-Świątkiewicz I, Gąstoł M (2012) Comparative study on mineral content of organic and conventional carrot, celery and red beet juice. *Acta Sci Pol Hortorum Cultus* 11: 173–183.
2. USDA Food Data Central (2022) Available from: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/746764/nutrients>

3. Zhu S, Wang Ch, Ramaswamy HS, et al. (2017) Phase transitions during high-pressure treatment of frozen carrot juice and influence on *Escherichia coli* inactivation. *Food Sci Technol* 79: 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.022>
4. Sokołowska B, Chotkiewicz M, Niezgoda J, et al. (2011) Evaluation of microbial contamination of commercially available unpasteurized, freshly squeezed fruit and vegetable juices. *Zesz Probl Postepow Nauk Roln* 569: 219–228.
5. Picouet PA, Sarraga C, Cofán S, et al. (2015) Effects of thermal and high-pressure treatments on the carotene content, microbiological safety and sensory properties of acidified and of non-acidified carrot juice. *LWT-Food Sci Technol* 62: 920–926. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.027>
6. Zhang Y, Liu X, Wang Y, et al. (2016) Quality comparison of carrot juices processed by high-pressure processing and high-temperature short-time processing. *Innovative Food Sci Emerging Technol* 33:135–144. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.10.012>
7. Huang HW, Lung HM, Yang BB, et al. (2014) Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing. *Food Control* 40: 250–259. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.007>
8. Wu D, Forghani F, Banan-Mwine Daliri E, et al. (2020) Microbial response to some nonthermal physical technologies. *Trends Food Sci Technol* 95: 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.012>
9. Yamamoto K, Zhang X, Inaoka T, et al. (2021) Bacterial injury induced by high hydrostatic pressure. *Food Eng Rev* 13: 442–453. <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09271-8>
10. Siderakou D, Zilelidou E, Poimenidou S, et al. (2021) Assessing the survival and sublethal injury kinetics of *Listeria monocytogenes* under different food processing-related stress. *Int J Food Microbiol* 346: 109159. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109159>
11. Wesche AM, Gurtler JB, Marks BP, et al. (2009) Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *J Food Protect* 72: 1121–1138. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.5.1121>
12. Wu VCH (2008) A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiol* 25: 735–744. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.011>
13. Kang DH, Fung DY. (2000) Application of thin agar layer method for recovery of injured *Salmonella Typhimurium*. *Int. J. Food Microbiol.* 54:127–132. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00174-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00174-9)
14. Kang DH, Fung DY. (1999) Thin agar layer method for recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. *J Food Protect* 62: 1346–1349. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.11.1346>
15. Wu VCH, Fung DY. (2001) Evaluation of thin agar layer method for recovery of heat-injured foodborne pathogens. *J Food Sci* 66: 580–583. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04605.x>
16. Wu VCH, Fung DY, Kang DH (2001a) Evaluation of thin agar layer method for recovery of cold-injured foodborne pathogens. *J Rapid Meth Auto Microbiol* 9: 11–25.
17. Wu VCH, Fung DY, Kang DH, et al. (2001b) Evaluation of thin agar layer method for recovery of acid-injured foodborne pathogens. *J Food Prot* 64: 1067–1071.
18. Chang VP, Mills EW, Cutter CN (2003) Comparison of recovery methods for freeze-injured *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Campylobacter coli* in cell suspensions and associated with pork surfaces. *J Food Prot* 66: 798–803. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.5.798>

19. Duan J, Liu C, Su YC (2006) Evaluation of a double layer agar plate for direct enumeration of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Food Sci* 71: M77–M82. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb08911.x>
20. Nasiłowska J, Sokołowska B, Fonberg-Broczek M (2019) Behavior of *Listeria innocua* strains under pressure treatment—Inactivation and sublethal injury. *Pol J Food Nutr Sci* 69: 45–52. <https://doi.org/10.31883/pjfns-2019-0004>
21. ISO 16649-2:2001 (2001) Microbiology of food and animal feeding stuff—Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide.
22. EN ISO 11290-2:2000/A1 (2000) Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method.
23. Pokhrel PR, Toniazzi T, Boulet CA, et al. (2019) Inactivation of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* in carrot juice by combining high-pressure processing, nisin, and mild thermal treatments. *Innovative Food Sci Emerging Technol* 54: 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.03.007>
24. Pokhrel PR, Boulet C, Yildiz S, et al. (2022) Effect of high hydrostatic pressure on microbial inactivation and quality changes in carrot-orange juice blends at varying pH. *LWT* 159: 113219. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113219>
25. Patterson MF, McKay AM, Connolly M, et al. (2012) The effect of high hydrostatic pressure on carrot juice's microbiological quality and safety during refrigerated storage. *Food Microbiol* 30: 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.09.013>
26. Van Opstal I, Vanmuysen SC, Wuytack EY, et al. (2005) Inactivation of *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure at different temperatures in buffer and carrot juice. *Int J Food Microbiol* 98: 179–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.022>
27. Pilavtepe-Çelik, Buzrul, Alpas H, et al. (2009) Development of a new mathematical model for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* by high hydrostatic pressure in carrot juice and peptone water. *J Food Eng* 90: 388–394. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.06.043>
28. Sokołowska B, Skąpska S, Niezgodna, et al. (2014) Inactivation and sublethal injury of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* by high hydrostatic pressure in model suspensions and beetroot juice. *High-Pressure Res* 34: 147–155. <https://doi.org/10.1080/08957959.2013.877458>
29. Jofré A, Aymerich T, Bover-Cid S, et al. (2010) Inactivation and recovery of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* after high hydrostatic treatments up to 900 MPa. *Int Microbiol* 13: 105–112.
30. United States Department of Agriculture (USDA) (2012) High-pressure processing (HPP) and inspection program personnel (IPP) verification responsibilities FSIS Directive 6120.1.
31. Jordan SL, Pascual C, Bracey E, et al. (2001) Inactivation and injury of pressure-resistant strains of *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *J Appl Microbiol* 91: 463–469. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01402.x>
32. Buzrul S, Alpas H, Largeteau A, et al. (2008) Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in kiwifruit and pineapple juices by high hydrostatic pressure. *Int J Food Microbiol* 124: 275–278. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.015>
33. Quiroz-González B, Rodríguez-Martínez V, García-Mateos MR, et al. (2018) High hydrostatic pressure inactivation and recovery study of *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* in pitaya (*Stenocereus prinosus*) juice. *Innovative Food Sci Emerging Technol* 50: 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.10.003>

34. Sz wajgier D, Baranowska-Wójcik E, Dosnowska B, et al. (2021) High-pressure processing at increased temperatures provides enhanced removal of indigenous microbial contamination in beet/carrot juice without damaging the bioactive components. *Int J Food Sci Technol* 57: 276–289. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15416>
35. Linton M, McClements JMJ, Patterson MF (2001) Inactivation of pathogenic *Escherichia coli* in skimmed milk using high hydrostatic pressure. *Innovative Food Sci Emerging Technol* 2: 99–104. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(01\)00033-9](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(01)00033-9)
36. Bayindirli A, Alpas H, Bozoglu F, et al. (2006) Efficiency of high-pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple, orange, apricot, and sour cherry juices. *Food Control* 17: 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.09.002>
37. Hajmeer MN, Fung DYC, Marsden JL, et al. (2001) Effects of preparation method, age, and plating technique of thin agar layer media on recovery of *Escherichia coli* O157:H7 injured by sodium chloride. *J Microbiol Meth* 47: 249–253. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00304-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00304-9)
38. Qiu X, Wu VCH (2007) Evaluation of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Staphylococcus aureus* in ground beef with cranberry concentrate by Thin Agar Layer Method. *J Rapid Meth Auto Microbiol* 15: 280–292. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4581.2007.00098.x>
39. Lavieri N, Sebranek JG, Cordray JC, et al. (2014) Evaluation of the Thin Agar Layer method for the recovery of pressure-injured and heat-injured *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 77: 828–831. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-374>



AIMS Press

© 2022 the Author(s), licensee AIMS Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>)

dr hab. inż. Barbara Sokołowska, prof. IBPRS

Warszawa, dn. 30.06.2023

Zakład Mikrobiologii

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego

im. prof. Wacława Dąbrowskiego - PIB

ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Justyna Nasiłowska, Barbara Sokołowska, Monika Fonberg-Broczek, 2022, ***Escherichia coli* and *Listeria innocua* stability in carrot juice preserved by high hydrostatic pressure**, AIMS Agriculture and Food, 7(3), 623-636, mój wkład w powstanie pracy polegał na pełnieniu funkcji promotora pracy doktorskiej, wsparciu merytorycznym oraz współudziale przy planowaniu badań i przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 10%.

Barbara Sokołowska

dr Monika Fonberg-Broczek

Warszawa, dn. 02.03.2023

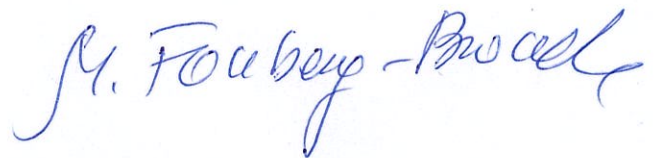
Instytut Wysokich Ciśnień PAN

ul. Sokołowska 29/37, 01-142 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Justyna Nasiłowska, Barbara Sokołowska, Monika Fonberg-Broczek, 2022, ***Escherichia coli*** and ***Listeria innocua*** stability in carrot juice preserved by high hydrostatic pressure, AIMS Agriculture and Food, 7(3), 623-636, mój wkład w powstanie pracy polegał na udostępnieniu aparatury do wykonania doświadczeń związanych z wykorzystaniem wysokiego ciśnienia hydrostatycznego. Mój udział procentowy szacuję na 5%.



WYKAZ POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

ANALIZA BIBLIOMETRYCZNA PUBLIKACJI (wg Scopus)

Publikacje oryginalne / w cyklu do rozprawy:	13/5
Publikacje przeglądowe / w cyklu do rozprawy:	0/0
Rozdziały w monografiach:	1
IF sumaryczny / w cyklu do rozprawy:	26,41/10,49
Punkty MNiSW/MEiN:	746
Liczba cytowań / bez autocytowań:	70/61
Indeks Hirsha:	5
Prezentacje ustne na konferencjach naukowych:	6
Plakaty na konferencjach:	18

Wykaz innych opublikowanych prac naukowych:

1. Świśłočka R., Świdorski G., **Nasiłowska J.**, Sokołowska B., Wojtczak A., Lewandowski W. 2023. Research on the electron structure and antimicrobial properties of mandelic acid and its alkali metal salts. *Int. J. of Molecular Scie.* 24, 3078. <https://doi.org/10.3390/ijms24043078> (140 pkt. MEiN; IF 6,208)
2. Jaroszevska E., **Nasiłowska J.**, Sokołowska B. 2023. Kolekcje kultur mikroorganizmów, a biobanki mikrobiologiczne w kontekście nowych norm ISO. *Advance. of Microbiol.*, 62, 1, 0–0, DOI: 10.2478/am-2023-000 (40 pkt. MEiN; IF 1,118)
3. Sokołowska B., Bucka-Kolendo J., Dekowska A., Mikołajczuk-Szczyrba A., **Nasiłowska J.** 2022. Zasoby kolekcji kultur drobnoustrojów przemysłowych – charakterystyka nowych izolatów bakterii octowych z rodzaju *Asaia*. *PNiTPRS.* 76(2) (20 pkt. MEiN)
4. AbouAitah K., Bil M., Pietrzykowska E., Szałaj U., Fudala D., Woźniak B., **Nasiłowska J.**, Świdorska-Środa A., Łojkowski M., Sokołowska B., Świeszkowski W., Łojkowski W. 2021. Drug-Releasing Antibacterial Coating Made from Nano-Hydroxyapatite Using the Sonocoating Method. *Nanomaterials.* 11, 1690. <https://doi.org/10.3390/nano11071690> (70 pkt. MEiN; IF 5,076)
5. Sokołowska B., **Nasiłowska J.** 2020. Controlling Spoilage and Pathogenic Microorganisms in Beetroot (*Beta vulgaris*) Juice by High Hydrostatic Pressure. W: Safety Issues in Beverage Production, vol 18, The Science of Beverages, wydawnictwo Elsevier, 79-104, doi.org/10.1016/B978-0-12-816679-6.00003-6 – monografia (20 pkt. MEiN)
6. Sokołowska B., **Nasiłowska J.**, Rutkowska M., Fonberg-Broczek M., Rzoska S. J. 2019. The usage of high hydrostatic pressure (HHP) to control food-borne pathogens in hummus. *High Pressure Research.* 39:3, 525-532, [doi:10.1080/08957959.2019.1630402](https://doi.org/10.1080/08957959.2019.1630402) (70 pkt. MNiSW; IF 1,593)

7. Sokołowska B., Woźniak Ł., Skąpska S., Porębska I., **Nasiłowska J.**, and Rzoska S. J. 2017. Evaluation of quality changes of beetroot juice after high hydrostatic pressure processing. *High Pressure Research*. vol. 37, no. 2, pp. 214–222. (70 pkt. MNiSW; IF 1,925)
8. **Nasiłowska J.**, Sokołowska B., Fonberg-Broczek M. 2016. The impact of high pressure on inactivation and sublethal injury of foodborne pathogens in beetroot juice, *PNiTPRS*, 71(1), 21-27 (5 pkt. MNiSW)
9. Sokołowska B., Niezgoda J., Dekowska A., Porębska I., **Nasiłowska J.**, Waldon-Wiewióra E., Kowalska M. 2016. Incidence of *Alicyclobacillus* spp. in polish apple and dark berry juice concentrates and the ability of isolated *A. acidoterrestris* strains to spoilage of these juices. *PNiTPRS*, 71(1), 5-20 (5 pkt. MNiSW)
10. Sokołowska B, Porębska I., **Nasiłowska J.**, Niezgoda J., Dekowska A. 2015. Inactivation Of The Native Microflora In Beetroot Juice By High Pressure Carbon Dioxide Combined With Temperature. *Pol. J. Natur. Sc.*, Vol 30(1): 81–89. (14 pkt. MNiSW)
11. **Nasiłowska J.**, Misiewicz A., Pietracha D. 2015. Niepewność pomiaru w mikrobiologii żywności. *Problemy Jakości*, nr 7-8, 50-55. (11 pkt. MNiSW)
12. **Nasiłowska J.**, Sokołowska B. 2015. Zastosowanie metody płytek dwuwarstwowych do regeneracji komórek *Escherichia coli* uszkodzonych subletalnie w wyniku działania ditlenku węgla w podwyższonym ciśnieniu, *PNiTPRS*, 70 (2), 66-76 (5 pkt. MNiSW)
13. **Nasiłowska J.**, Sokołowska B. 2014. Zastosowanie pulsacyjnego pola elektrycznego do utrwalania soków owocowych i warzywnych. *Przem. Ferm Owoc. Warz.* 58(04), 22-24. (5 pkt. MNiSW)

Publikacje w czasopismach branżowych:

1. **Nasiłowska J.** 2018. Wykrywanie po nowemu. *Kierunek Spożywczy*, 1, 38-41.
2. **Nasiłowska J.** 2018. Dezynfekcja warzyw i owoców. *Kierunek Spożywczy* 2, 8-12.
3. **Nasiłowska J.**, Kowalska, M. 2017. Można szybciej można czulej. *Kierunek Spożywczy*, 1, 62-66.
4. **Nasiłowska J.** 2016. Jednodniowy sok. Wiele wyzwań. *Kierunek Spożywczy*, 4, 45-49.
5. **Nasiłowska J.** 2016. Co potrafi CO₂. *Kierunek Spożywczy*, 3, 50-53.
6. **Nasiłowska J.** 2015. Producentcie, nie bądź BURAK... *Agro Przemysł*, 3, 43-47.
7. **Nasiłowska J.** 2015. Ciśnienie na utrwalenie czyli zastosowanie wysokich ciśnień hydrostatycznych w przemyśle owocowo-warzywnym. *Agro Przemysł*, 2, 64-68.

Plakaty w języku polskim:

1. Sokołowska B., Woźniak Ł., Skąpska S., Porębska I., **Nasiłowska J.**, Rzoska S., Wpływ wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) na zawartość barwników betalainowych i naturalną mikroflorę soku z buraków ćwikłowych, IX Ogólnopolska Konferencja Naukowa Technologów Przetwórstwa Owoców i Warzyw, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, PTTŻ, 19-20.05.2016
2. **Nasiłowska J.**, Sokołowska B., Zastosowanie metody płytek dwuwarstwowych do regeneracji komórek uszkodzonych subletalnie w procesach utrwalania soków, VII Ogólnopolska Konferencja Naukowa Technologów Przetwórstwa Owoców i Warzyw, Olsztyn, 2014.

Plakaty w języku angielskim:

1. Sokołowska B., Bucka-Kolendo J., Dekowska A., Mikołajczuk-Szczyrba A., **Nasiłowska J.** Isolation and identification of new acetic bacteria of the genus *Asaia* –

- resources of the IAFB Collection of Industrial Microorganisms. International Conference on Culture Collections. 12-16 czerwca 2023, Braga, Portugalia
2. **Nasiłowska J.**, Kołtunowicz K., Mróz K., Mikołajczuk-Szczyrba A., Wojtczak A., Sokołowska B. IAFB Culture Collection of Industrial Microorganisms - the new microbiological resources - current research and new application. XL Annual Meeting of the European Culture Collections' Organisation. 27 - 29 września 2022. Brunszwik, Niemcy
 3. Sokołowska B., **Nasiłowska J.**, Woszczyk M. Effect of *Lactobacillus brevis* cells growth phase on inactivation and sublethal injury caused by high pressure. 57th European High Pressures Research Group International Meeting. 1-6 września 2019, Praga, Czechy – **nagrodzony I miejsce**
 4. **Nasiłowska J.**, Sokołowska B. Sublethal pressure treatment on pathogens in vegetable juices. XXXVIII Annual Meeting of the European Culture Collections' Organisation. 12 - 14 czerwca 2019. Turyn, Włochy
 5. **Nasiłowska J.**, Sokołowska B., Fonberg-Broczek M. The risk of the sublethally injured cells regeneration in vegetable juices during long-term storage after mild HHP treatment. 56th European High Pressures Research Group International Meeting. 2-8 września 2018, Aveiro, Portugalia
 6. Sokołowska B., Woszczyk M., **Nasiłowska J.**, Michałowska D., Raczkowska A. Potential of high pressure technology to inactivation of *Lactobacillus brevis* in beer, 55 th European High Pressures Research Group International Meeting, materiały konferencyjne, 3-8 września 2017 Uniwersytet Adama Mickiewicza w Poznaniu, Polska
 7. Sokołowska B., Woźniak Ł., Skąpska S., Porębska I., **Nasiłowska J.**, Rzoska S., Evaluation of quality changes of beetroot juice after high hydrostatic pressure (HHP) processing, 54 th EHPRG International Meeting, 4-9 września 2016, Uniwersytet Bayreuth, Niemcy
 8. Sokołowska B., Woźniak Ł., Skąpska S., Porębska I., **Nasiłowska J.**, Rzoska S., Effect of high hydrostatic pressure (HHP) or supercritical carbon dioxide (SCCD) on betalain content and microbiological quality of beetroot juice, 29 th EFFoST International Conference - Food Science Research and Innovation. 10-12 listopada 2015, Ateny, Grecja
 9. **Nasiłowska J.**, Sokołowska B., Porębska I., Rutkowska M., Skąpska S., Rzoska S., The impact of high hydrostatic pressure on inactivation and sublethal injury of foodborne pathogens in beetroot juice, 29 EFFoST International Conference - Food Science Research and Innovation. 10-12 listopada 2015, Ateny, Grecja
 10. **Nasiłowska J.**, Sokołowska B., Inactivation and sublethal injury of *Listeria innocua* in beetroot juice after high hydrostatic pressure and during storage, EHPRG 53-International Conference on High Pressure Science and Technology. 30 sierpnia – 04 września 2015, Madryt, Hiszpania
 11. **Nasiłowska J.**, Sokołowska B., Porębska I., Inactivation and sublethal injury of *Listeria innocua* by high pressure carbon dioxide, 8th International Conference on High Pressure Biosciences and Biotechnology, 2014, Nantes, Francja
 12. **Nasiłowska J.**, Sokołowska B., Skąpska S., Rzoska S., Fonberg-Broczek M., Comparison of recovery methods for enumeration of injured *Listeria innocua* cells in beetroot juice under pressure and during refrigerated storage, 52nd Meeting of the European High Pressure Research Group, 2014, Lyon, Francja
 13. Sokołowska B., Porębska I., **Nasiłowska J.**, Niezgodna J., Dobros N., Impact of high pressure carbon dioxide on native microflora and colour of beetroot juice, 8th International Conference on High Pressure Biosciences and Biotechnology, 2014, Nantes, Francja

14. Misiewicz A., Goncerzewicz A., **Nasiłowska J.**, Presence and activities of basic mycotoxins genes of *Fusarium* sp. Strains, XXXII Annual Meeting of the European Culture Collections' Organisation, 2013, Ateny, Grecja
15. Zdziennicki F., **Nasiłowska J.**; Misiewicz A., Pietracha D., Application of molecular methods to identification of filamentous fungi, MIKROBIOT, 2013
16. Misiewicz A., Goncerzewicz A., **Nasiłowska J.**, Jaroszevska E., Polymorphisms of flo genes in *Saccharomyces cerevisiae* brewers' yeasts, XXXI Annual Meeting of the European Culture Collections' Organisation, 2012, Braga, Portugalia

Komunikaty naukowe (doniesienia) w języku polskim:

1. **Nasiłowska J.**, Sokołowska B., XLII Sesja Naukowa Komitetu Nauk o Żywności PAN, „Technika wysokich ciśnień hydrostatycznych w aspekcie inaktywacji bakterii z rodzaju *Listeria* w soku z buraków ćwikłowych.”, 25-26 czerwca 2015, Lublin
2. **Nasiłowska J.**, Sokołowska B., XLIII Sesja Naukowa Komitetu Nauk o Żywności i Żywieniu Polskiej Akademii Nauk, „Ocena stanu fizjologicznego patogenów w soku z marchwi po procesie utrwalania wysokimi ciśnieniami hydrostatycznymi.”, 4-5 lipca 2017, Wrocław
3. **Nasiłowska J.**, Sokołowska B. XXIII Sesja Naukowa Sekcji Młodej Kadry Naukowej w „Wpływ warunków przechowywania soków z warzyw korzeniowych utrwalanych wysokim ciśnieniem hydrostatycznym na regenerację uszkodzonych komórek bakterii patogennych.”, 24-25.05.2018, Lublin

Komunikaty naukowe (doniesienia) w języku angielskim:

1. **Nasiłowska J.**, Sokołowska B. Viability of pathogens in vegetable juices under high hydrostatic pressure treatment. VII International Session of Young Scientific Staff. Polskie Towarzystwo Technologów Żywności - Oddział Olsztyński, 23-24 maja 2019
2. Bucka-Kolendo J., Woszczyk M., **Nasiłowska J.**, Sokołowska B. Heterogeneity between *Lactobacillus brevis* strains exposed to high hydrostatic pressure. 56th European High Pressures Research Group International Meeting. 2-8 września 2018, Aveiro, Portugalia
3. **Nasiłowska J.**, Sokołowska B., Fonberg-Broczek M. 55 th EHPRG International Meeting, High pressure processing of vegetable juices: evaluation of sublethal injured pathogen cells during long term storage using plate count methods and microscopy methods, 3-8 września 2017 Uniwersytet Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Działalność popularno-naukowa: wykład/prezentacja w mediach:

1. **Nasiłowska J.** Uszkodzenia subletalne komórek w procesach utrwalania żywności, Warszawa, Spotkanie robocze Grupy ANIMEX - bioMerieux, 20.05.2015,
2. **Nasiłowska J.** Uszkodzenia subletalne drobnoustrojów występujących w żywności-przyczyny i metody wykrywania, Gdańsk-Sobieszewo, MaagLab-Gdańska Fundacja Wody, 22-24.06.2015.

Wykaz projektów krajowych i międzynarodowych

1. PROMISEANG (Alternative PROteins from Microbial fermentation of non-conventional SEA sources for Next-Generation food, feed and non-food bio-based applications) HORIZON-JU-CBE-2022-R-04; okres trwania projektu: wrzesień 2023 - sierpień 2027
2. „Nowe pochodne roślinnych kwasów karboksylowych jako aktywne składniki biopreparatów bezpiecznych dla człowieka i środowiska naturalnego.” NCN Program

OPUS 16 w ramach umowy UMO-2018/31/B/NZ7/03083, okres trwania projektu: 28.06.2019-27.06.2022

3. IS_MIRRI21 (Implementation and Sustainability of Microbial Resource Research Infrastructure for 21st Century) H2020-INFRADEV-2018-2020/H2020-INFRADEV-2019-2; Grant Agreement nr: 871129; okres trwania projektu: -styczeń 2020 - lipiec 2023
4. POIR.01.01.01-00-1584/15/15 Prace B+R nad stworzeniem trzech innowacyjnych technologii w branży przetwórstwa owocowo-warzywnego. MARWIT Sp. z o.o./IBPRS 05.01.2017 - 30.06.2020

Prace naukowo-badawcze realizowane w IBPRS:

1. Sokołowska B, **Nasiłowska J.**, Mikołajczuk-Szczyrba A., Wetoszka U., Dąbrowska K. Prowadzenie Kolekcji Kultur bakterii, drożdży i grzybów strzępkowych oraz stworzenie ich bazy danych. Temat BST o symbolu: ZM-119-01, czas realizacji: kwiecień 2019 - marzec 2020
2. **Nasiłowska J.**, Sokołowska B. Ocena stanu fizjologicznego patogenów w sokach z warzyw korzeniowych po procesie utrwalania wysokim ciśnieniem hydrostatycznym (HHP) – badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej (ostatni etap realizacji). Fundusz Badań Własnych 510-01-ZM-02, kierownik, czas realizacji: sierpień 2018 - grudzień 2018
3. **Nasiłowska J.**, Sokołowska B., Duda M. Ocena stanu fizjologicznego komórek *Escherichia coli* i *Listeria innocua* subletalnie uszkodzonych w wyniku działania wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP). Temat BST o symbolu: 500-01-ZO-02, kierownik, czas realizacji: luty – grudzień 2017
4. **Nasiłowska J.**, Sokołowska B., Niezgodna J., Porębska I., Dekowska A., Waldon-Wiewióra E. Uszkodzenia subletalne *Escherichia coli* i *Listeria innocua* wywoływane działaniem wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) oraz możliwości ich regeneracji w trakcie przechowywania. Temat BST o symbolu: 500-01-ZO-01, współautor/kierownik, czas realizacji: kwiecień 2014- grudzień 2015.
5. **Nasiłowska J.**, Sokołowska B. Uszkodzenia subletalne mikroorganizmów w procesie utrwalania soków metodami nietermicznymi - optymalizacja metody oznaczania. Temat BST o symbolu: 500-01-ZO-07, współautor, czas realizacji: grudzień 2013 - lipiec 2014.
6. Zdziennicki F., Misiewicz A., Bryła M., Pietracha D., **Nasiłowska J.** Zastosowanie metod molekularnych do identyfikacji grzybów strzępkowych. Temat BST o symbolu: 500-01-ZM-03, współautor, czas realizacji: styczeń – grudzień 2013

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy w czytelni biblioteki Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego - PIB im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie.

.....
(czytelny podpis autora)