UNIWERSYTET
WARMIŃSKO-MAZURSKI
W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ NAUKI O ŻYWNOŚCI

Dziedzina: nauki rolnicze

Dyscyplina: technologia żywności i żywienia

mgr inż. Patryk Wiśniewski

Rozprawa doktorska

Wpływ technologii wysokich ciśnień (HPP) na zmiany w wirulencji i antybiotykooporności szczepów *Listeria monocytogenes* izolowanych z żywności i środowiska jej produkcji

The impact of high-pressure processing (HPP) on changes in virulence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environments

Praca wykonana w Katedrze Mikrobiologii Żywności, Technologii i Chemii Mięsa

Promotor: dr hab. inż. Anna Zadernowska, prof. UWM

Promotor pomocniczy: dr hab. inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska, prof. UWM

Olsztyn 2026

Olsztyn, dn. 09.06.2026 r.
(miejscowość, data)

mgr inż. Patryk Wiśniewski
(imię i nazwisko kandydata)

Technologia żywności i żywienia
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE
o samodzielnym napisaniu rozprawy doktorskiej

Świadomy odpowiedzialności prawnej oświadczam, że rozprawa doktorska pod tytułem **„Wpływ technologii wysokich ciśnień (HPP) na zmiany w wirulencji i antybiotykooporności szczepów *Listeria monocytogenes* izolowanych z żywności i środowiska jej produkcji"** została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie jest i nie była wcześniej podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Ponadto oświadczam, że treść rozprawy doktorskiej przedstawionej przez mnie do obrony, zawarta na przekazywanym nośniku elektronicznym, jest identyczna z jej wersją drukowaną.

W związku z powyższym oświadczam, że wyrażam zgodę na poddanie rozprawy doktorskiej procedurze antyplagiatowej.

Wiśniewski Patryk
.....
(podpis kandydata)

Olsztyn, dn. 09.06.2026 r.
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Anna Zadernowska, prof. UWM
(stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko
promotora/~~promotora pomocniczego~~*)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE
promotora/~~promotora pomocniczego~~* rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że rozprawa doktorska **mgr inż. Patryka Wiśniewskiego** pod tytułem **„Wpływ technologii wysokich ciśnień (HPP) na zmiany w wirulencji i antybiotykooporności szczepów *Listeria monocytogenes* izolowanych z żywności i środowiska jej produkcji"** została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Anna Zadernowska
.....
(podpis promotora)

* *niepotrzebne skreślić*

Olsztyn, dn. 09.06.2026 r.
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska, prof. UWM
(stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko
~~promotora~~/promotora pomocniczego*)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE
~~promotora~~/promotora pomocniczego* rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że rozprawa doktorska **mgr inż. Patryka Wiśniewskiego** pod tytułem **„Wpływ technologii wysokich ciśnień (HPP) na zmiany w wirulencji i antybiotykooporności szczepów *Listeria monocytogenes* izolowanych z żywności i środowiska jej produkcji”** została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Wioleta Chajęcka-Wierzchowska
(podpis promotora)

* *niepotrzebne skreślić*

Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

NARODOWE CENTRUM NAUKI

Informacja o finansowaniu badań

Badania naukowe prowadzone w ramach realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki:

1. Finansowanie z projektu zewnętrznego przez **Narodowe Centrum Nauki** w Krakowie w ramach konkursu **OPUS 15**, nr 2018/29/B/NZ9/00645 – Tytuł projektu: *Wpływ technologii płotków i obróbki sous vide na ekspresję czynników wirulencji i genów oporności na antybiotyki u Listeria monocytogenes i Enterococcus* sp. Pełniona funkcja: **wykonawca projektu**; Okres trwania: 10.01.2019 – 09.01.2024; Wartość projektu: 1 223 800 zł
2. Finansowanie z projektu zewnętrznego przez **Narodowe Centrum Nauki** w Krakowie w ramach konkursu **PRELUDIUM 23**, nr 2024/53/N/NZ9/00833, środki finansowe przeznaczone na wsparcie badań prowadzonych przez osoby rozpoczynające karierę naukową, nieposiadające stopnia naukowego doktora – Tytuł projektu: *Potencjał i mechanizmy zmiany wrażliwości na antybiotyki u Listeria monocytogenes w warunkach stresu wywołanego paskalizacją.* Pełniona funkcja: **kierownik projektu**. Okres trwania: 03.02.2024 – 02.02.2028; Wartość projektu: 209 840 zł.
3. Finansowanie publikacji jednego z artykułów naukowych w formule otwartego dostępu zostało dofinansowane w ramach programu Ministra Edukacji i Nauki **Projekt RID: „Wspólne zdrowie ludzi i zwierząt: od zrównoważonej produkcji żywności po nowatorskie terapie”** „Regionalna Inicjatywa Doskonałości” w latach 2024 – 2027, nr projektu 010/RID/2018/19, kwota finansowania 12 000 000 złotych.

Wykaz publikacji stanowiących przedmiot rozprawy doktorskiej

Przedmiot niniejszej rozprawy doktorskiej stanowi cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych (przeglądu literatury oraz badań laboratoryjnych) opublikowanych w czasopismach wymienionych w wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW).

Pełne teksty wymienionych poniżej prac wraz z oświadczeniami współautorów publikacji stanowią załączniki do niniejszej pracy.

P1. Wiśniewski, P., Zakrzewski, A. J., Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W. (2022). Antimicrobial Resistance and Virulence Characterization of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Food and Food Processing Environments. *Pathogens*, 11, 1099. https://doi.org/10.3390/pathogens11101099.

[1] MNiSW – 100; [2] IF – 3.7; [3] WoS – 48; [4] GS – 63; [5] RG – 58

Mój wkład merytoryczny w przygotowanie publikacji polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich dyskusji na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekcie artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny).

P2. Wiśniewski, P., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2023). High-Pressure Processing – Impacts on the Virulence and Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolated from Food and Food Processing Environments. *Foods*, 12, 3899. https://doi.org/10.3390/foods12213899.

[1] MNiSW – 140; [2] IF – 4.7; [3] WoS – 13; [4] GS – 17; [5] RG – 15

Mój wkład merytoryczny w przygotowanie publikacji polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich dyskusji na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekcie artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny).

P3. Wiśniewski, P., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2024). High-Pressure Processing Influences Antibiotic Resistance Gene Transfer in *Listeria monocytogenes* Isolated from Food and Processing Environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 25, 12964. https://doi.org/10.3390/ijms252312964.

[1] MNiSW – 140; [2] IF – 4.9; [3] WoS – 5; [4] GS – 8; [5] RG – 6

Mój wkład merytoryczny w przygotowanie publikacji polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich dyskusji na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekcie artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz współprowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa.

P4. Wiśniewski, P., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2024). Impact of High-Pressure Processing (HPP) on *Listeria monocytogenes* – An Overview of Challenges and Responses. *Foods*, 13, 14. https://doi.org/10.3390/foods13010014.

[1] MNiSW – 140; [2] IF – 5.1; [3] WoS – 24; [4] GS – 30; [5] RG – 24

Mój wkład merytoryczny w przygotowanie publikacji polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich dyskusji na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekcie artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny).

P5. Wiśniewski, P., Zadernowska, A. (2026). Application of pascalisation in the control of *Listeria* sp. in beverages – Effectiveness, limitations, and future prospects. *Food Microbiology*, 134, 104932. https://doi.org/10.1016/j.fm.2025.104932.

[1] MNiSW – 140; [2] IF – 4.6; [3] WoS – 0; [4] GS – 0; [5] RG – 0

[1] Liczba punktów zgodnie z Komunikatami MNiSW w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych zgodna z rokiem opublikowania publikacji naukowej
[2] Impact Factor (IF) wg listy *Journal Citation Reports* (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania
[3] Liczba cytowań wg bazy *Web of Science* (WoS) (z wyłączeniem autocytowań)
[4] Liczba cytowań wg bazy *Google Scholar* (GS) (z wyłączeniem autocytowań)
5 Liczba cytowań wg portalu *ResearchGate* (RG) (z wyłączeniem autocytowań)

Mój wkład merytoryczny w przygotowanie publikacji polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, przeprowadzeniu analizy literatury, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich dyskusji na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekcie artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny).

Sumaryczna liczba punktów MNiSW – 580

Sumaryczny Impact Factor (IF) – 23

Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW 12

STRESZCZENIE 14

ABSTRACT 15

1. WSTĘP – UZASADNIENIE PODJĘCIA BADAŃ 16
1.1. *LISTERIA MONOCYTOGENES* 17
1.1.1. Charakterystyka 17
1.1.2. Wirulencja 18
1.1.3. Oporność na antybiotyki 19
1.1.4. Występowanie w żywności i ramy regulacyjne 21
1.2. TECHNOLOGIA WYSOKICH CIŚNIEŃ 22
1.2.1. Zasada działania i mechanizm inaktywacji 22
1.2.2. Parametry procesu oraz zastosowanie 23
1.3. WPŁYW TECHNOLOGII WYSOKICH CIŚNIEŃ NA *LISTERIA MONOCYTOGENES* 23
1.3.1. Parametry procesu 23
1.3.2. Właściwości matrycy żywnościowej 25
1.3.3. Zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe i barotolerancja szczepów 26
1.3.4. Ryzyka i ograniczenia 26
1.3.5. Technologia wysokich ciśnień jako czynnik stresowy 27
1.3.5.1. Wpływ na oporność na antybiotyki 27
1.3.5.2. Wpływ na ekspresję genów 28

2. CEL BADAŃ 29
2.1. GŁÓWNY CEL BADAWCZY 29
2.2. SZCZEGÓŁOWE CELE BADAWCZE 29

3. HIPOTEZY BADAWCZE 30

4. ORGANIZACJA BADAŃ 31

5. MATERIAŁY I METODY BADAŃ 33
5.1. IDENTYFIKACJA IZOLATÓW – POTWIERDZENIA RODZAJOWE I GATUNKOWE 33
5.2. OKREŚLENIE SEROTYPU 33
5.3. WSTĘPNE BADANIA PRZESIEWOWE 34

5.3.1. Ocena czynników wirulencji 34
5.3.1.1. Zdolność produkcji śluzu 34
5.3.1.2. Zdolność tworzenia biofilmu 34
5.3.1.3. Ocena częstości występowania genów wirulencji 34
5.3.2. Ocena oporności na antybiotyki 34
5.3.2.1. Ocena fenotypowej oporności na antybiotyki 34
5.3.2.2. Ocena genotypowej oporności na antybiotyki 35
5.4. BADANIA FUNKCJONALNE 36
5.4.1. Kryteria wyboru szczepów 36
5.4.2. Badania oporności na antybiotyki - wartości minimalnych stężeń hamujących .. 36
5.4.3. Analiza występowania genów oporności na antybiotyki 37
5.4.4. Analiza występowania genów wirulencji 37
5.5. WPŁYW TECHNOLOGII WYSOKICH CIŚNIEŃ NA ODPOWIEDŹ KOMÓRKOWĄ *LISTERIA MONOCYTOGENES* 38
5.5.1. Technologia wysokich ciśnień 38
5.5.2. Przeżywalność i możliwość regeneracji 38
5.5.3. Zmiany profilu oporności na antybiotyki 39
5.5.4. Zmiany w zdolności wytwarzania śluzu i tworzenia biofilmu 39
5.5.5. Zmiany w profilu ekspresji genów kodujących oporność na antybiotyki i wirulencję 40
5.5.5.1. Ekstrakcja RNA i odwrotna transkrypcja do cDNA 40
5.5.5.2. Ekspresja genów wirulencji i oporności na antybiotyki 40
5.6. ANALIZA TRANSFERU GENÓW OPORNOŚCI NA ANTYBIOTYKI 41
5.6.1. Charakterystyka szczepów – dawcy i biorca 41
5.6.2. Analiza wpływu technologii wysokich ciśnień na transfer genów oporności w warunkach in vitro i in situ 42
5.6.2.1. Technologia wysokich ciśnień 42
5.6.2.2. Analiza przeżywalności i regeneracji po obróbce HPP 42
5.6.2.3. Zmiana profilu oporności na antybiotyki 43
5.6.2.4. Analiza transferu genów oporności na antybiotyki 43
5.7. ANALIZY STATYSTYCZNE 46
6. WYNIKI 48
6.1. CHARAKTERYSTYKA IZOLATÓW – IDENTYFIKACJA I OKREŚLENIE SEROTYPU 48

6.2. WYNIKI BADAŃ PRZESIEWOWYCH 48
6.2.1. Ocena czynników wirulencji 48
6.2.1.1. Zdolność tworzenia biofilmu i wytwarzania śluzu 48
6.2.1.2. Ocena obecności genów wirulencji 49
6.2.2. Ocena oporności na antybiotyki 49
6.2.2.1. Ocena fenotypowej oporności 49
6.2.2.2. Ocena genotypowej oporności 50
6.3. WYNIKI BADAŃ FUNKCJONALNYCH 50
6.3.1. Badania oporności na antybiotyki wyselekcjonowanych szczepów 51
6.3.2. Analiza genów oporności i wirulencji 52
6.4. WPŁYW TECHNOLOGII WYSOKICH CIŚNIEŃ NA ODPOWIEDŹ KOMÓRKOWĄ SZCZEPÓW *L. MONOCYTOGENES* 52
6.4.1. Wpływ na przeżywalność i regenerację szczepów 52
6.4.2. Wpływ na zmiany fenotypu oporności na antybiotyki 53
6.4.3. Wpływ na zmiany w zdolności wytwarzania śluzu i tworzenia biofilmu 54
6.4.4. Wpływ na zmiany ekspresji genów oporności i wirulencji 54
6.5. ANALIZA TRANSFERU GENÓW OPORNOŚCI NA ANTYBIOTYKI 56
6.5.1. Charakterystyka szczepów donorowych 56
6.5.2. Wpływ HPP na transfer genów oporności 56
6.5.2.1. Częstotliwość transferu genów 56
6.5.2.2. Potwierdzenie transferu i lokalizacja genów u transkoniugantów 57
6.5.2.3. Charakterystyka uzyskanych transkoniugantów 58
7. DYSKUSJA 59
8. WNIOSKI I STWIERDZENIA KOŃCOWE 64
9. SPIS TABEL I RYCIN 67
9.1. SPIS RYCIN 67
9.2. SPIS TABEL 67
10. LITERATURA 68
CAŁKOWITE ZESTAWIENIE DOROBKU NAUKOWEGO 86
ZAŁĄCZNIKI 105

Wykaz skrótów

ALOA	Agar Listeria według Ottaviani and Agosti
BHI	Brain Heart Infusion Broth
cDNA	komplementarny DNA
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute – Instytut Norm Klinicznych i Laboratoryjnych
CN	Gentamycyna
CRA	Congo Red Agar – metoda z czerwienią Kongo
DA	Klindamycyna
DNA	Kwas deoksyrybonukleinowy
ERIC-PCR	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus – Polymerase Chain Reaction
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości
HGT	Horizontal gene transfer – horyzontalny transfer genów
HPP	High-Pressure Processing – technologia wysokich ciśnień, paskalizacja
L. monocytogenes	*Listeria monocytogenes*
LIPI	Listeria Pathogenicity Islands – wyspy patogeniczności
LLS	Listeriolysin S
MDR strains	Multidrug-resistant strains – szczepy wielooporne
MEM	Meropenem
MIC	Minimum inhibitory concentration – minimalne stężenie hamujące
OD	Optical density – gęstość optyczna
ODc	Wartość odcięcia gęstości optycznej
P	Penicylina
PCR	Polymerase Chain Reaction – reakcja łańcuchowa polimerazy
R/I/S	Klasyfikacja wrażliwości bakterii na antybiotyki: resistant (R) – oporny; intermediate (I) – wrażliwy przy zwiększonej ekspozycji; susceptible (S) – wrażliwy
RNA	Kwas rybonukleinowy
RTE	Ready-to-eat – żywność gotowa do spożycia
SOS	System naprawy DNA

SXT	Trimetoprim/sulfametoksazol
TBE	Bufor Tris-Borate-EDTA
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
UHT	Ultra High Temperature – sterylizacja UHT
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean – metoda nieobciążonego łączenia średnich
$\boldsymbol{\sigma^B}$	Czynnik sigma B

Streszczenie

Zdolność bakterii do adaptacji do warunków stresowych stanowi istotny czynnik determinujący ich przeżycie oraz zagrożenie dla bezpieczeństwa żywności. Szczególne znaczenie ma technologia wysokich ciśnień (HPP), która oprócz inaktywacji drobnoustrojów może wywoływać stres subletalny i indukować zmiany na poziomie fenotypowym i molekularnym.

Celem pracy była ocena wpływu HPP na przeżywalność, wirulencję, antybiotykooporność oraz potencjał transferu genów oporności u szczepów *Listeria monocytogenes* izolowanych z żywności i środowiska jej produkcji, z uwzględnieniem trwałości obserwowanych zmian po regeneracji komórek.

Wykazano, że skuteczność inaktywacji zależała od wartości ciśnienia i rodzaju matrycy żywnościowej. Ciśnienie 200 MPa nie powodowało istotnej redukcji liczby komórek, natomiast 400 MPa prowadziło do ich eliminacji poniżej progu detekcji w warunkach in vitro. Parametry subletalne umożliwiały regenerację bakterii, którą obserwowano po 72 godzinach zarówno in vitro, jak i in situ. Stwierdzono, że działanie HPP prowadziło do zmian profilu antybiotykooporności oraz modulacji ekspresji genów związanych z wirulencją i opornością. Zmiany te utrzymywały się po regeneracji komórek i obejmowały wzrost wartości minimalnych stężeń hamujących (MIC) oraz zwiększoną oporność m.in. na tetracyklinę, linkomycynę i fosfomycynę, a także zmiany ekspresji genów *tet* oraz *hly* i *actA*. Ponadto wykazano wpływ HPP na zwiększenie częstotliwości transferu genów oporności, szczególnie w warunkach in situ.

Uzyskane wyniki wskazują, że mimo wysokiej skuteczności HPP, jej działanie subletalne może sprzyjać utrwalaniu zmian adaptacyjnych u *L. monocytogenes*. Podkreśla to konieczność optymalizacji parametrów procesu oraz uwzględniania zdolności regeneracji bakterii w ocenie bezpieczeństwa żywności.

Słowa kluczowe: *Listeria monocytogenes*; antybiotykooporność; ekspresja genów; transfer genów; technologia wysokich ciśnień

Abstract

The ability of bacteria to adapt to stressful conditions is a key factor determining their survival and posing a threat to food safety. High-pressure processing (HPP) is of particular significance, as, in addition to inactivating microorganisms, it can induce sublethal stress and trigger changes at the phenotypic and molecular levels.

The aim of this study was to assess the effect of HPP on the survival, virulence, antibiotic resistance and potential for the transfer of resistance genes in *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and its production environment, including the durability of the observed changes following cell recovery.

The effectiveness of inactivation was shown to depend on the pressure value and the type of food matrix. A pressure of 200 MPa did not result in a significant reduction in cell numbers, whereas 400 MPa led to their elimination below the detection limit under in vitro conditions. Sublethal parameters allowed for bacterial recovery, which was observed after 72 hours both in vitro and in situ. It was found that HPP treatment led to changes in the antibiotic resistance profile and the modulation of gene expression associated with virulence and resistance. These changes persisted after cell recovery and included an increase in minimum inhibitory concentrations (MICs) and enhanced resistance to, among others, tetracycline, lincomycin and fosfomycin, as well as changes in the expression of the *tet*, *hly,* and *actA* genes. Furthermore, the effect of HPP on increasing the frequency of resistance gene transfer was demonstrated, particularly under in situ conditions.

The results obtained indicate that, despite the high efficacy of HPP, its sublethal effect may promote the consolidation of adaptive changes in *L. monocytogenes*. This highlights the need to optimize process parameters and to consider the regenerative capacity of bacteria in food safety assessments.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; antibiotic resistance; gene expression; gene transfer; high pressure technology

1. Wstęp – uzasadnienie podjęcia badań

Bezpieczeństwo mikrobiologiczne żywności stanowi jeden z kluczowych elementów zdrowia publicznego oraz istotne wyzwanie dla współczesnego przemysłu spożywczego (Lorenzo i in., 2018). W ostatnich latach obserwuje się dynamiczny wzrost zapotrzebowania konsumentów na produkty minimalnie przetworzone, które zachowują naturalne walory smakowe, wartości odżywcze i właściwości bioaktywne (Gomes i in., 2023). Trend ten wymusza wdrażanie zaawansowanych technologii utrwalania, które zapewniają bezpieczeństwo mikrobiologiczne przy jednoczesnym ograniczeniu strat jakościowych.

Tradycyjne metody utrwalania, takie jak pasteryzacja, choć skuteczne w eliminacji drobnoustrojów, mogą prowadzić do niekorzystnych zmian sensorycznych i obniżenia zawartości składników odżywczych (Rahman, 2020). W odpowiedzi na te ograniczenia coraz częściej stosuje się nietermiczne technologie przetwarzania żywności, w tym technologię wysokich ciśnień (z *ang*. High-Pressure Processing – HPP; paskalizacja) (Lee i in., 2024). HPP polega na poddaniu produktu działaniu ciśnienia w zakresie 100–600 MPa i należy do najważniejszych metod nietermicznego utrwalania. Rosnące znaczenie tych technologii znajduje odzwierciedlenie w prognozach rynkowych – globalny rynek nietermicznego przetwarzania żywności, wyceniany w 2024 roku na 180 miliardów USD, ma osiągnąć wartość 250 miliardów USD do roku 2033 (Markwide Research Report, 2025).

Pomimo licznych zalet i rosnącej popularności nietermicznych metod utrwalania żywności, ich stosowanie wiąże się z koniecznością dogłębnej analizy potencjalnych, niezamierzonych konsekwencji dla mikroorganizmów obecnych w żywności (Aganovic i in., 2021; Nesterova i in., 2024). Szczególną uwagę poświęca się patogenom przenoszonym przez żywność, w tym bakteriom, stanowiącym istotne i dynamiczne zagrożenie, zdolnym do zanieczyszczania produktów na każdym etapie łańcucha produkcyjnego – od surowca aż po dystrybucję. Ich obecność, zwłaszcza w produktach niepoddawanych tradycyjnej pasteryzacji, stwarza poważne ryzyko dla konsumentów (Bintsis, 2017; Abebe i in., 2020; Hassan i in., 2024).

W tym kontekście *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) uznawana jest za jeden z najgroźniejszych patogenów w przemyśle spożywczym (Wiktorczyk-Kapischke i in., 2021). *L. monocytogenes* wykształciła mechanizmy pozwalające na przetrwanie procesów technologicznych i adaptację do warunków stresowych panujących podczas wytwarzania żywności, co stanowi poważne i nieustające wyzwanie dla zapewnienia jej bezpieczeństwa (Ferreira i in., 2016; Wiktorczyk-Kapischke i in., 2021). Dodatkowym, narastającym

problemem jest antybiotykooporność wśród *L. monocytogenes*. Chociaż tradycyjnie patogen ten uważany jest za wrażliwy na standardowe antybiotyki, coraz częściej izoluje się szczepy wielooporne (Olaimat i in., 2018; Iwu i in., 2020). Zjawisko to, w połączeniu z faktem, że wiele determinantów genetycznych odpowiedzialnych za oporność na antybiotyki zlokalizowanych jest na ruchomych elementach genetycznych, wymusza konieczność ciągłego monitorowania i badania mechanizmów lekooporności, zwłaszcza w żywności minimalnie przetworzonej (Olaimat i in., 2018).

Rosnące zagrożenia mikrobiologiczne, w połączeniu ze zmieniającymi się trendami konsumenckimi ukierunkowanymi na produkty niskoprzetworzone i naturalne, stawiają przed przemysłem spożywczym wyzwanie poszukiwania innowacyjnych, a zarazem bezpiecznych metod utrwalania żywności.

1.1. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes należy do najważniejszych zagrożeń mikrobiologicznych w przemyśle spożywczym. Wynika to zarówno z jej cech adaptacyjnych, jak i z ciężkiego przebiegu listeriozy (Quereda i in., 2021; EFSA & ECDC, 2024).

1.1.1. Charakterystyka

Listeria monocytogenes to Gram-dodatnia pałeczka, szeroko rozpowszechniona w środowisku naturalnym, takim jak woda, gleba czy roślinność, a także u zwierząt. Zdolność do przetrwania w niekorzystnych warunkach, takich jak niska temperatura, wysokie stężenie soli i niskie pH, czyni ją istotnym zagrożeniem dla bezpieczeństwa żywności (Cavalcanti i in., 2022; Tahir i in., 2022). Głównym źródłem zakażeń dla człowieka jest zanieczyszczona żywność, w szczególności produkty gotowe do spożycia (RTE), takie jak wędzone ryby, produkty mięsne (np. kiełbasy, wędliny), sery (zwłaszcza miękkie, dojrzewające), a także mrożone warzywa, owoce i soki (Centers for Disease Control and Prevention, 2024). W ostatnich latach na całym świecie odnotowano liczne ogniska listeriozy związane ze spożyciem różnorodnych produktów spożywczych: w Europie (Magalhães i in., 2012; European Centre for Disease Prevention and Control, 2018a, 2018b, 2019; World Health Organization, 2019), Stanach Zjednoczonych (Centers for Disease Control and Prevention, 2014–2022; Chen i in., 2016; Self i in., 2019), Afryce (WHO, 2018) i Australii (Das i in., 2019).

Kluczową cechą z punktu widzenia bezpieczeństwa żywności jest zdolność do przetrwania i wzrostu w warunkach chłodniczego przechowywania żywności –

L. monocytogenes jest typowym psychrotrofem (Tasara & Stephan, 2006). Cecha ta stanowi fundamentalne wyzwanie dla przemysłu spożywczego, ponieważ tradycyjne metody kontroli oparte na łańcuchu chłodniczym, które skutecznie hamują wzrost większości patogenów, w przypadku *L. monocytogenes* okazują się niewystarczające (Tasara & Stephan, 2006). Bakteria ta może namnażać się w produktach RTE podczas ich przechowywania, stwarzając bezpośrednie zagrożenie dla konsumentów (Bozoglu i in., 2004; Centers for Disease Control and Prevention (CDC)).

Zakażenie *L. monocytogenes* prowadzi do wywołania listeriozy – choroby charakteryzującej się wysokim wskaźnikiem hospitalizacji i śmiertelności, szczególnie niebezpiecznej dla osób z tzw. grup wysokiego ryzyka, do których zalicza się: osoby starsze, kobiety w ciąży, noworodki oraz osoby z obniżoną odpornością, np. w wyniku chorób nowotworowych, HIV/AIDS czy leczenia immunosupresyjnego (European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, 2024; Quereda i in., 2021). Poważny przebieg kliniczny listeriozy sprawia, że jest ona traktowana jako jedno z najpoważniejszych zagrożeń przenoszonych przez żywność. Zrozumienie jej epidemiologii w łańcuchu żywnościowym jest zatem kluczowe dla ochrony zdrowia publicznego (Walczycka, 2005; Scallan i in., 2011).

Różnorodność genetyczna i fenotypowa szczepów *L. monocytogenes* przekłada się na zmienność w zakresie wirulencji, barotolerancji i występowania genów oporności, co komplikuje ocenę ryzyka w kontekście stosowania nowych technologii przetwarzania żywności (Duru i in., 2020).

1.1.2. Wirulencja

Patogeniczność *L. monocytogenes* jest procesem złożonym, obejmującym liczne czynniki wirulencji. Geny kodujące te czynniki często zlokalizowane są na tzw. wyspach patogenności (Listeria Pathogenicity Islands – LIPI), z których najważniejsze to: LIPI-1 (odpowiadająca za wewnątrzkomórkowy cykl życiowy; m.in. *prfA, hly, plcA/plcB, actA*), LIPI-3 (koduje listeriolizynę S – LLS) oraz LIPI-4 (związana z infekcjami układu nerwowego i łożyska). W literaturze wskazuje się na zróżnicowanie rozkładu tych wysp i powiązanie niektórych elementów (np. LLS lub LIPI-4) z wyższą wirulencją lub tropizmem do określonych tkanek (Cotter i in., 2008; Maury i in., 2016; Chen i in., 2019; de Melo Tavares i in., 2020; Disson i in., 2021).

Regulacja ekspresji genów wirulencji i odpowiedź na stres są ściśle skorelowane. Głównym regulatorem jest białko PrfA, a szeroką rolę w koordynacji odpowiedzi na stres

i wirulencję odgrywa czynnik sigma B (σ^B) (Bhunia, 2018; Lopes-Luz i in., 2021). Modulacja tych regulatorów wpływa na adhezję, inwazję komórek nabłonkowych, czynniki odpowiedzialne za rozprzestrzenianie się między komórkami oraz ucieczkę z wakuoli (Tabela 1) (Bhunia, 2018; Disson i in., 2021). Ekspresja tych genów może być modyfikowana przez warunki środowiskowe i procesy przetwarzania żywności (np. HPP), a reakcja ta jest często zależna od szczepu (Pérez-Baltar i in., 2021; Duru i in., 2021).

Tabela 1. Wybrane czynniki wirulencji u *L. monocytogenes* i ich funkcje.

Kategoria	Czynnik wirulencji / Gen	Funkcja
Regulacja	PrfA	Główny regulator ekspresji wielu genów wirulencji.
Odpowiedź na stres	Sigma B (σ^B)	Regulacja genów związanych ze stresem i wirulencją.
Adhezja do komórek	Białko adhezyjne *Listeria* (LAP)	Adhezja do komórek nabłonka jelitowego; zakłócenie bariery nabłonkowej jelita.
	Białko wiążące fibronektynę (FbpA)	Adhezja do komórek gospodarza; działa jako białko opiekuńcze stabilizujące i wydzielające LLO i InlB.
Inwazja komórek	Internalina A (InlA)	Promuje internalizację bakterii do enterocytów i przechodzenie przez barierę jelitową.
	Internalina B (InlB)	Uczestniczy w inwazji enterocytów i przechodzeniu przez komórki M kępek Peyera.
Liza wakuoli	Listeriolizyna O (LLO) / *hly*	Hemolizyna, która uszkadza błonę fagosomu, umożliwiając ucieczkę bakterii do cytoplazmy.
	Fosfolipaza / *plcA*/*plcB*	Liza błony wakuolarnej, wspomagająca ucieczkę bakterii.
Rozprzestrzenianie	Białko polimeryzacji aktyny (ActA)	Inicjuje polimeryzację aktyny, tworząc "ogon" umożliwiający ruch wewnątrzkomórkowy i przemieszczanie się do sąsiednich komórek.
	Fosfolipaza C specyficzna dla fosfatydylocholiny (PC-PLC)	Wspomaga lizę dwubłonowej wakuoli podczas rozprzestrzeniania się między komórkami.

Opracowanie na podstawie Tabeli 1 – Bhunia, 2018; Lopes-Luz i in., 2021 (**P4**).

1.1.3. Oporność na antybiotyki

L. monocytogenes pozostaje generalnie wrażliwa na szerokie spektrum antybiotyków stosowanych w terapii listeriozy, wykazując naturalną oporność na wybrane klasy związków przeciwdrobnoustrojowych, w tym fosfomycynę, cefalosporyny trzeciej generacji oraz niektóre chinolony, co potwierdzono w badaniach fenotypowych (Noll i in., 2018; Olaimat i in., 2018). Jednakże istotnym i narastającym problemem jest oporność nabyta, która rozwija się głównie

w wyniku horyzontalnego transferu genów (HGT) z udziałem ruchomych elementów genetycznych, takich jak plazmidy, transpozony czy integrony, pomiędzy bakteriami środowiskowymi, w tym *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., a także pomiędzy szczepami rodzaju *Listeria* (Olaimat i in., 2018). Najczęściej identyfikowaną cechą oporności nabytej w populacjach *L. monocytogenes* jest oporność na tetracykliny, determinowana obecnością genów *tetM* oraz *tetS* (Li i in., 2016; Chen i in., 2018). Ponadto w genomach szczepów izolowanych z żywności oraz środowiska produkcyjnego wykrywa się determinanty oporności wobec innych grup antybiotyków, obejmujące m.in. geny *tetM* i *tetA* kodujący oporność na tetracykliny (Li i in., 2016; Granier i in., 2011; Lim i in., 2016) gen *ermB* odpowiedzialny za oporność na makrolidy (Granier i in., 2011; Lim i in., 2016; Wilson i in., 2018), *dfrD* kodujący oporność na trimetoprim (Granier i in., 2011), *fosX* związany z opornością na fosfomycynę (Lim i in., 2016; Zakrzewski i in., 2023), a także mechanizmy efflux, takie jak *Lde*, warunkujące obniżoną wrażliwość na fluorochinolony (Godreuil i in., 2003; Chen i in., 2018). Równolegle obserwuje się wzrost częstości występowania szczepów wieloopornych (MDR), w tym izolowanych ze świeżych produktów spożywczych, wykazujących oporność na antybiotyki o istotnym znaczeniu klinicznym w leczeniu listeriozy, takie jak amoksycylina, erytromycyna, sulfametoksazol, penicyliny, tetracykliny oraz gentamycyna (Kayode & Okoh, 2022, 2023). Fakt, że wiele determinant oporności zlokalizowanych jest na ruchomych elementach genetycznych, sprzyja ich dalszemu rozprzestrzenianiu się w łańcuchu żywnościowym, co stanowi istotne zagrożenie z punktu widzenia zdrowia publicznego (Olaimat i in., 2018).

Zjawisko współselekcji również odgrywa rolę w oporności na antybiotyki tych szczepów. Ekspozycja na biocydy (np. chlorek benzalkoniowy stosowany do mycia i dezynfekcji w przemyśle spożywczym) lub metale ciężkie może współselekcjonować determinaty antybiotykowe i mechanizmy efflux, co dokumentują badania eksperymentalne oraz analizy izolowanych populacji (Rakic-Martinez i in., 2011; Kovacevic i in., 2013).

Ponadto w badaniach raportowano obecność tzw. cichych genów oporności (ang. *silent resistance genes*) w genomie patogenów izolowanych z żywności, które w warunkach standardowych pozostają nieaktywne fenotypowo, lecz mogą zostać aktywowane przez określone stresory środowiskowe lub przetwórcze, co stwarza dodatkowe ryzyko potęgowania zjawiska oporności na antybiotyki (Deekshit i Srikumar 2022). Z perspektywy procesów przetwórczych istnieją dowody i hipotezy naukowe, wskazujące na to, że stresy subletalne (np. uszkodzenia błony, stres oksydacyjny, uszkodzenia DNA) powstające podczas np. HPP mogą indukować reakcję SOS (system naprawy DNA) i modyfikować przepuszczalność błony, co teoretycznie zwiększa prawdopodobieństwo poboru i transferu materiału genetycznego (w tym

plazmidów z genami oporności) (Aertsen i in., 2004; Baharoglu i in., 2010; Sehrawat i in., 2021).

Obecność antybiotykoopornych szczepów *L. monocytogenes* w łańcuchu żywnościowym uzasadnia potrzebę monitorowania genów oporności, oceny potencjału horyzontalnego transferu genów oraz badania wpływu subletalnych parametrów HPP na cechy fenotypowe i genetyczne patogenu (Olaimat i in., 2018; Thomas & Nielsen, 2005; Zhao i in., 2017).

1.1.4. Występowanie w żywności i ramy regulacyjne

L. monocytogenes jest istotnym czynnikiem zanieczyszczającym żywność RTE, w tym produkty minimalnie przetworzone, takie jak soki owocowe i warzywne (Zhu i in., 2017; Olaimat i in., 2018). Produkty minimalnie przetworzone, również te poddane obróbce HPP, są szczególnie podatne na zanieczyszczenie, ponieważ brak w nich tradycyjnych barier hamujących wzrost drobnoustrojów. Dlatego też bezwzględnie wymagają one przechowywania w warunkach chłodniczych w całym okresie przydatności do spożycia (Zhu i in., 2017). Analiza danych pochodzących z krajów Unii Europejskiej wskazuje na paradoksalną sytuację: podczas gdy rutynowe badania próbek żywności RTE wykazują stosunkowo niski poziom zanieczyszczenia *L. monocytogenes*, liczba zgłaszanych przypadków listeriozy u ludzi systematycznie rośnie (EFSA & ECDC, 2024). Dane epidemiologiczne wskazują na niepokojący wzrost liczby zachorowań w Unii Europejskiej. W 2023 roku odnotowano rekordową liczbę 2952 przypadków listeriozy, co stanowi wzrost o 5,8% w porównaniu z rokiem poprzednim. Choroba ta była piątą najczęściej zgłaszaną zoonozą w UE i jest uznawana za jedną z najpoważniejszych chorób przenoszonych przez żywność głównie ze względu na ciężki przebieg kliniczny, wysoką częstość hospitalizacji oraz istotną śmiertelność (EFSA & ECDC, 2024). Najnowsze dane zawarte w raporcie The European Union One Health 2024 Zoonoses Report (EFSA & ECDC 2025) potwierdzają dalsze nasilenie tego niekorzystnego trendu. W 2024 roku w Unii Europejskiej zgłoszono 3041 potwierdzonych inwazyjnych przypadków listeriozy, co odpowiada współczynnikowi zapadalności na poziomie 0,69 przypadków na 100 000 ludności. Oznacza to wzrost o 3,0% w porównaniu z rokiem 2023 (0,67/100 000) i jednocześnie najwyższą liczbę przypadków oraz najwyższy wskaźnik notyfikacji od 2007 roku. Analiza trendu wieloletniego wskazuje na statystycznie istotny wzrost częstości zakażeń *L. monocytogenes* w okresie 2020–2024, co podkreśla narastające znaczenie tego patogenu w kontekście zdrowia publicznego w Europie.

W odpowiedzi na rosnące zagrożenie spowodowane *L. monocytogenes*, Unia Europejska zaostrzyła kryteria bezpieczeństwa żywności dotyczące tego patogenu. Rozporządzenie

Komisji (UE) 2024/2895, nowelizujące rozporządzenie (WE) nr 2073/2005, wprowadziło bardziej rygorystyczne wymogi w związku z rosnącą liczbą przypadków listeriozy (Komisja Europejska, 2024; European Centre for Disease Prevention and Control ECDC, 2024). Zgodnie z nowymi przepisami, *L. monocytogenes* musi być nieobecna w 25 gramach żywności gotowej do spożycia przez cały okres jej przydatności, chyba że producent jest w stanie udowodnić, że liczba komórek patogenu nie przekroczy 100 jtk/g. Tak rygorystyczne przepisy wymuszają na przemyśle spożywczym poszukiwanie i walidację wysoce skutecznych metod utrwalania, gwarantujących zgodność produktów z nowymi wymogami (Rozporządzenie Komisji (UE) 2024/2895, 2024).

1.2. Technologia wysokich ciśnień

Technologia wysokich ciśnień jest niskotemperaturową, nietermiczną metodą utrwalania żywności, zaprojektowaną do inaktywacji patogenów i mikrobioty psującej przy minimalnym wpływie na cechy sensoryczne i wartość odżywczą produktów. Jej rosnące wdrożenia w przemyśle wynikają z popytu konsumentów na produkty gotowe do spożycia z „czystą etykietą" (clean-label) oraz zachowanych cechach jakościowych (Nabi i in., 2021; Huang i in., 2017).

1.2.1. Zasada działania i mechanizm inaktywacji

Podstawowa zasada działania HPP opiera się na prawie Pascala, zgodnie z którym ciśnienie jest natychmiastowo i równomiernie przenoszone w całej objętości produktu za pośrednictwem medium transmisyjnego (Pinto i in., 2020; Sehrawat i in., 2021; Nabi i in., 2021). Proces ten, niezależny od wielkości i kształtu opakowania, prowadzi do inaktywacji drobnoustrojów poprzez kilka kluczowych mechanizmów – główne z nich to: destabilizacja i permeabilizacja błon komórkowych skutkująca utratą integralności barierowej, denaturacja białek strukturalnych i enzymatycznych z utratą aktywności katalitycznej, zaburzenia struktur rybosomalnych i energetycznych, oraz indukcja uszkodzeń materiału genetycznego w postaci pęknięć nici DNA (Pinto i in., 2020; Ferreira i in., 2016; Sehrawat i in., 2021). Wszystkie te procesy przyczyniają się do zatrzymania metabolizmu i śmierci komórek.

1.2.2. Parametry procesu oraz zastosowanie

Technologia HPP polega na poddaniu zapakowanego produktu spożywczego działaniu bardzo wysokiego ciśnienia, zazwyczaj w zakresie od 100 do 600 MPa, przez określony czas, zwykle od kilku do kilkunastu minut. Proces odbywa się w temperaturze pokojowej lub niższej, a medium przenoszącym ciśnienie jest najczęściej woda (Pinto i in., 2020). Technologia HPP znalazła szerokie zastosowanie komercyjne w produkcji różnorodnych grup produktów, takich jak soki i napoje, warzywa, przetwory mięsne, produkty mleczne i owoce morza (Bolumar i in., 2021; Campus, 2010; Ozaybi, 2024). Jej główną zaletą jest zdolność do skutecznej redukcji patogenów i mikrobioty psującej, przy jednoczesnym zachowaniu smaku, aromatu, barwy oraz wartości odżywczych produktu, w tym witamin i związków bioaktywnych (Abera, 2019). Europejski rynek urządzeń HPP również dynamicznie się rozwija, co świadczy o rosnących inwestycjach w tę technologię, zwłaszcza w sektorze soków i napojów (Virtue Market Research, 2024).

Mimo ugruntowanej pozycji HPP jako skutecznej metody utrwalania, jej oddziaływanie na patogeny tak oporne jak *L. monocytogenes* jest procesem złożonym, którego efektywność zależy od wielu, ściśle powiązanych ze sobą czynników (Campus, 2010; Virtue Market Research, 2024)

1.3. Wpływ technologii wysokich ciśnień na *Listeria monocytogenes*

Decydującą rolę w stopniu inaktywacji *L. monocytogenes* odgrywają kluczowe parametry procesu HPP: wartość ciśnienia, czas trwania procesu oraz temperatura, w której jest przeprowadzany (Ferreira i in., 2016; Possas i in., 2017). Zależności te należy jednak rozpatrywać w kontekście barier wspomagających, takich jak przechowywanie czy kwasowość matrycy, w sytuacji badań in situ (Aganovic i in., 2016; Cheng i in., 2024; Scolari i in., 2015; Petrus i in., 2020). Dogłębna analiza tych współzależności pozwala na precyzyjne dostosowanie parametrów HPP do specyfiki produktu w celu osiągnięcia maksymalnej skuteczności mikrobiologicznej przy jednoczesnym zachowaniu jego jakości.

1.3.1. Parametry procesu

Zastosowany poziom ciśnienia determinuje skuteczność inaktywacji. Ciśnienie na poziomie ≤ 300 MPa jest na ogół nieskuteczne w eliminacji tego patogenu i może prowadzić jedynie do częściowej redukcji populacji i subletalnych uszkodzeń komórek, które mogą się

regenerować podczas przechowywania produktu (Petrus i in., 2020; Hwang i in., 2023). Wartości w zakresie 300–400 MPa wykazują umiarkowaną skuteczność, często niewystarczającą do osiągnięcia pożądanej redukcji logarytmicznej. Wyniki są silnie uzależnione od innych parametrów procesu, matrycy żywnościowej oraz cech konkretnych szczepów. W soku ogórkowym ciśnienie 300 MPa było niewystarczające, podczas gdy 400 MPa pozwoliło na redukcję populacji o 5–6 log, w zależności od szczepu (Bucur i in., 2020). Badania przeprowadzone przez Gouvea i in. (2020) oraz Alego i in. (2020) wykazały istotną skuteczność analizowanych metod w ograniczaniu liczby drobnoustrojów, uzyskując znaczącą redukcję mikrobiologiczną, w tym przekraczającą poziom 6 log. W koktajlach warzywno-owocowych ciśnienia powyżej 400 MPa również okazały się skuteczne (Gonzalez-Tejedor i in., 2023). Wartości ciśnienia w zakresie > 500 MPa najczęściej prowadzą do całkowitej eliminacji *L. monocytogenes* poniżej progu detekcji. W soku jabłkowym ciśnienie 561 MPa przez 110 sekund spowodowało całkowitą redukcję patogenu (Petrus i in., 2020), a w wodzie kokosowej ciśnienie 593 MPa przez 3 minuty skutecznie obniżyło poziom *L. monocytogenes* do wartości niewykrywalnych (Raghubeer i in., 2020). Należy jednak podkreślić, że progi te dotyczą przede wszystkim HPP jako samodzielnego zabiegu. Niższe ciśnienia mogą być skuteczne, gdy są połączone z innymi barierami (Scolari i in., 2015; Zacconi i in., 2015).

Czas trwania procesu, czyli czas przetrzymywania produktu pod zadanym ciśnieniem, jest drugim kluczowym czynnikiem. Jest on odwrotnie proporcjonalny do zastosowanego ciśnienia. Krótsze czasy przetwarzania wymagają wyższych ciśnień, podczas gdy niższe ciśnienia muszą być kompensowane dłuższym czasem ekspozycji, zwłaszcza w produktach o neutralnym pH, aby osiągnąć ten sam poziom inaktywacji (Bucur i in., 2020; Nasiłowska i in., 2018). Wydłużenie czasu obróbki jest niezbędne do zapewnienia pełnej redukcji drobnoustrojów, szczególnie gdy stosowane są umiarkowane poziomy ciśnienia. Krótszy czas może być niewystarczający do wywołania nieodwracalnych uszkodzeń w komórkach bakteryjnych (Riekkinen i in., 2023). W badaniach nad sokiem jabłkowym wykazano, że ciśnienie 350 MPa było skuteczne (redukcja >5 log) tylko wtedy, gdy czas jego oddziaływania wynosił co najmniej 110 sekund (Petrus i in., 2020). Z kolei w soku z buraków dziki szczep *Listeria innocua* (organizm modelowy dla *L. monocytogenes*) wymagał 10 minut obróbki przy ciśnieniu 400 MPa, podczas gdy szczep z kolekcji został wyeliminowany już po 1 minucie. Ten przykład doskonale ilustruje, jak czas procesu i oporność konkretnego szczepu są ze sobą nierozerwalnie związane (Nasiłowska i in., 2018).

Istotny wpływ na proces ma również temperatura. Prowadzenie paskalizacji w niskich temperaturach (4–8°C) może zwiększać skuteczność inaktywacji i zapobiegać regeneracji

uszkodzonych komórek po zabiegu, co jest szczególnie ważne w kontekście możliwości rozwoju *L. monocytogenes* w warunkach chłodniczego przechowywania żywności (Bucur i in., 2020; Raghubeer i in., 2020). Badania wykazały, że HPP w soku ogórkowym w temperaturze 8°C pozwoliło na znaczną redukcję *L. monocytogenes* (Bucur i in., 2020). Podobnie, woda kokosowa przetwarzana w 4°C pozostała stabilna mikrobiologicznie przez cały okres przechowywania (120 dni) (Raghubeer i in., 2020). Z kolei wyższe temperatury (>20°C) mogą również poprawić wydajność procesu (poprzez obniżenie ciśnienia lub skrócenia czasu procesu), jednak niosą ze sobą ryzyko niepożądanych zmian sensorycznych (m.in. zmiana barwy i smaku) oraz utraty wartości odżywczej w produkcie (Scolari i in., 2015; Nasiłowska i in., 2018). W badaniach nad smoothie z jagód, zastosowanie ciśnienia 300 MPa w temperaturze 45°C pozwoliło na redukcję *L. monocytogenes* o 5 log w znacznie krótszym czasie (Scolari i in., 2015). Z drugiej strony, w soku z buraków temperatura 20°C w połączeniu z ciśnieniem 400 MPa mogła prowadzić do niekorzystnych zmian barwy produktu (Nasiłowska i in., 2018).

1.3.2. Właściwości matrycy żywnościowej

Niezwykle istotny jest również wpływ matrycy żywnościowej. Skład chemiczny i struktura fizyczna napoju, czyli jego matryca, to krytyczny czynnik determinujący skuteczność HPP (Baptista i in., 2016). Jednym z najważniejszych parametrów jest kwasowość czynna (pH). W produktach o niskim pH, takich jak soki owocowe, kwasowość środowiska działa synergistycznie z ciśnieniem, znacząco zwiększając skuteczność inaktywacji *L. monocytogenes* (Cheng i in., 2024). W przeciwieństwie do tego, w sokach warzywnych o wyższym pH (np. z marchwi) patogen wykazuje znacznie większą przeżywalność, co wymaga zastosowania bardziej intensywnych parametrów HPP (Hwang i in., 2023).

Dodatkowo, składniki takie jak białka, tłuszcze i błonnik, obecne w złożonych matrycach (np. smoothie), mogą wykazywać działanie baroprotekcyjne. Zawieszone w produkcie włókna błonnika i inne składniki bioaktywne mogą tłumić przenoszenie ciśnienia, podczas gdy cząstki stałe tworzą ochronne mikrośrodowiska, zamykając komórki bakteryjne w osłoniętych „kieszeniach". Jednocześnie biopolimery mogą oddziaływać z powierzchnią komórek, stabilizując ich błony i zwiększając odporność mechaniczną (Sehrawat i in., 2021; Zhao i in., 2023; Daher i in., 2017; Koutsoumanis i in., 2022). W rezultacie, w celu osiągnięcia pożądanego poziomu redukcji patogenu w takich produktach, konieczne jest zastosowanie wyższego ciśnienia i/lub dłuższego czasu przetwarzania.

1.3.3. Zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe i barotolerancja szczepów

Istotnym wyzwaniem w stosowaniu HPP jest zróżnicowana oporność na ciśnienie (barotolerancja) poszczególnych szczepów *L. monocytogenes* (Duru i in., 2020). Badania wykazują, że nawet w identycznych warunkach procesu i w tej samej matrycy żywnościowej, tempo inaktywacji może się znacznie różnić (Duru i in., 2021; Hwang i in., 2023). Przykładowo, w soku z ogórka poddanym działaniu ciśnienia 400 MPa, redukcja dla szczepu *L. monocytogenes* Scott A wyniosła 6 log, podczas gdy dla szczepu RO15 tylko 5 log (Bucur i in., 2020). Szeroko zakrojone badanie przeprowadzone przez Bruschi i in. (2017) na 14 różnych szczepach *L. monocytogenes* potwierdziło dużą zmienność wewnątrzgatunkową pod względem wrażliwości na HPP. Zmienność ta sprawia, że badania walidacyjne procesu HPP muszą być prowadzone z wykorzystaniem różnych, najbardziej barotolerancyjnych szczepów, istotnych dla danego środowiska żywnościowego.

1.3.4. Ryzyka i ograniczenia

Technologia HPP, mimo swojej udowodnionej skuteczności, nie jest pozbawiona ograniczeń, które mogą wpływać na końcowe bezpieczeństwo mikrobiologiczne produktu. Kluczowe wyzwania obejmują zjawisko subletalnego uszkadzania komórek, które mogą odzyskać zdolność do wzrostu podczas przechowywania (Hwang i in., 2023; Bozoglu i in., 2004), przejście bakterii w trudny do wykrycia stan fizjologiczny komórek (Koutsoumanis i in., 2022) oraz potencjalne zmiany w ich właściwościach, takich jak wirulencja czy oporność na antybiotyki, w populacji, która przetrwała proces (Duru i in., 2020; Duru i in., 2021; Chen i in., 2021).

1.3.4.1. Uszkodzenia subletalne i regeneracja

Jednym z najważniejszych mechanizmów przetrwania bakterii w warunkach stresu, takiego jak wysokie ciśnienie, jest przejście w stan „żywotny, lecz niehodowalny” (Viable But Non-Culturable, VBNC). Komórki w stanie VBNC pozostają metabolicznie aktywne i zachowują potencjał patogenny, jednak tracą zdolność do wzrostu na standardowych podłożach hodowlanych. Stanowi to poważne ryzyko dla bezpieczeństwa żywności, ponieważ tradycyjne metody kontroli mikrobiologicznej mogą nie wykryć ich obecności, co prowadzi do fałszywie negatywnych wyników i błędnej oceny bezpieczeństwa produktu (Wideman i in., 2021; Zhao i in., 2017).

Badania wskazują, że komórki *L. monocytogenes* uszkodzone subletalnie przez HPP mogą podczas dalszego przechowywania odzyskać zdolność do namnażania (nawet w warunkach chłodniczych) co potwierdzają badania przeprowadzone w różnych matrycach żywnościowych (Tomasula i in., 2014; Bozoglu i in., 2004; Nakaura i in., 2019). W serze Queso Fresco regenerację i wzrost *L. monocytogenes* obserwowano po 42 dniach nawet po zastosowaniu 600 MPa (Tomasula i in., 2014). W mleku UHT komórki *L. monocytogenes* ponownie wykryto już po 6 dniach w 4°C pomimo eliminacji wykrywalnych populacji przy 550 MPa (Bozoglu i in., 2004), a w badaniach na podłożach płynnych uszkodzone komórki odzyskiwały zdolność do wzrostu w 5-15°C, osiągając lub przekraczając poziom wyjściowy (Nakaura i in., 2019).

Zdolność komórek do odnowy zależy od warunków przechowywania, w tym temperatury. Jak wykazano, regeneracja może zachodzić również w warunkach chłodniczych, co ma istotne znaczenie w przypadku produktów utrwalanych metodą HPP, które zwykle są dystrybuowane i przechowywane w niskiej temperaturze (Nakaura i in., 2019; Hwang i in., 2023)

1.3.5. Technologia wysokich ciśnień jako czynnik stresowy

HPP należy postrzegać nie tylko jako metodę inaktywacji, ale również jako czynnik stresu środowiskowego. Subletalne traktowanie z wykorzystaniem HPP może uruchamiać u *L. monocytogenes* złożone genetyczne mechanizmy odpowiedzi na stres, co może wpływać na ich patogenność oraz zmiany profilu antybiotykooporności.

1.3.5.1. Wpływ na oporność na antybiotyki

Dostępne dane wskazują na potencjalnie niepokojące zależności. Stwierdzono, że szczepy *L. monocytogenes* wykazujące oporność na antybiotyki mogą jednocześnie charakteryzować się wyższą przeżywalnością po obróbce HPP przy ciśnieniu 400 MPa (Bruschi i in., 2017). Sugeruje to możliwość istnienia wspólnych mechanizmów oporności na różne rodzaje stresu. Wysokie ciśnienie jest czynnikiem genotoksycznym, powodującym uszkodzenia materiału genetycznego, w tym pęknięcia nici DNA. Uszkodzenia te prowadzą do silnej indukcji bakteryjnej odpowiedzi SOS – komórkowego mechanizmu ratunkowego, aktywowanego w odpowiedzi na zagrożenie integralności DNA (Lima-Noronha i in., 2022).

Co więcej, istnieje potencjalne zagrożenie, że subletalne warunki HPP mogą sprzyjać horyzontalnemu transferowi genów oporności na antybiotyki między komórkami. Mechanizm

tego zjawiska może być dwojaki. Po pierwsze, HPP powoduje zmiany w strukturze i zwiększenie przepuszczalności błony komórkowej, co może ułatwiać pobieranie plazmidów i innych mobilnych elementów genetycznych niosących geny oporności (Sehrawat i in., 2021). Po drugie, aktywacja systemu SOS uruchamia geny odpowiedzialne za naprawę i rekombinację DNA oraz aktywację integrazy integronów, co z kolei może nasilać procesy rekombinacji i transferu genów (Aertsen i in., 2004; Baharoglu i in., 2010)

1.3.5.2. Wpływ na ekspresję genów

Stres wywołany wysokim ciśnieniem indukuje w komórkach *L. monocytogenes* złożoną odpowiedź na poziomie transkrypcyjnym, prowadząc do zmian w ekspresji genów związanych zarówno z odpowiedzią na stres, jak i z wirulencją (Duru i in., 2020; Duru i in., 2021; Chen i in., 2021). Kluczową rolę w regulacji odpowiedzi na stres i patogenności odgrywa alternatywny czynnik transkrypcyjny sigma B (σ^B) (Bhunia, 2018; Lopes-Luz i in., 2021). Aktywacja σ^B w odpowiedzi na niekorzystne warunki może prowadzić do zmian w ekspresji genów wirulencji, co potencjalnie wpływa na zwiększenie chorobotwórczości patogenu (Wemekamp-Kamphuis i in., 2004).

Jak wskazują dostępne badania, wpływ HPP na ekspresję genów jest silnie zależny od szczepu i warunków eksperymentalnych. Pérez-Baltar i in. (2020, 2021) zaobserwowali, że w zależności od serotypu, HPP może prowadzić zarówno do nadekspresji (serotyp 1/2b), jak i supresji (wyciszaniu ekspresji) (serotyp 1/2c) kluczowych genów wirulencji, takich jak *plcA*, *hly* (kodujący listeriolizynę O) i *sigB*. Z kolei badania Bowman i in. (2008) wykazały, że HPP prowadziło do supresji genów *sigB* oraz *prfA*, głównego regulatora wirulencji u *L. monocytogenes*. Ta zmienność odpowiedzi komórkowej dodatkowo komplikuje ocenę ryzyka związanego z komórkami *L. monocytogenes*, które przetrwały proces.

Przedstawione zagadnienia teoretyczne zostały omówione w publikacjach:

P4. Wiśniewski, P., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2024). Impact of High-Pressure Processing (HPP) on *Listeria monocytogenes* – An Overview of Challenges and Responses. *Foods*, 13, 14. https://doi.org/10.3390/foods13010014.

P5. Wiśniewski, P., Zadernowska, A. (2026). Application of pascalisation in the control of *Listeria* sp. in beverages – Effectiveness, limitations, and future prospects. *Food Microbiology*, 134, 104932. https://doi.org/10.1016/j.fm.2025.104932.

2. Cel badań

Przedstawiony stan wiedzy ukazuje wyraźną rozbieżność. Z jednej strony – technologia wysokich ciśnień jest uznaną i skuteczną metodą utrwalania żywności, mogącą zapewniać bezpieczeństwo mikrobiologiczne przy zachowaniu wysokiej jakości produktów. Z drugiej strony – jej subletalne oddziaływanie na fizjologię i genetykę *L. monocytogenes* pozostaje słabo zbadane i może generować nowe, niedoceniane dotąd zagrożenia, takie jak selekcja szczepów barotolerancyjnych, indukcja wirulencji i oporności na antybiotyki czy promowanie transferu genów antybiotykooporności.

2.1. Główny cel badawczy

W świetle przedstawionych przesłanek głównym problemem badawczym podjętym w ramach rozprawy doktorskiej jest ocena warunków stresowych zachodzących podczas utrwalania żywności z zastosowaniem technologii wysokich ciśnień na możliwość przeżycia i odpowiedź komórkową szczepów *L. monocytogenes* wyizolowanych z żywności i środowiska jej produkcji.

2.2. Szczegółowe cele badawcze

Główny cel rozprawy został osiągnięty poprzez realizację celów szczegółowych, które obejmowały:

1. Usystematyzowanie i krytyczną analizę aktualnego stanu wiedzy dotyczącego wpływu technologii wysokich ciśnień na *L. monocytogenes*.
2. Charakterystykę bazy izolatów *L. monocytogenes* pod kątem cech fenotypowych i genotypowych warunkujących ich wirulencję oraz oporności na antybiotyki.
3. Ocenę wpływu technologii wysokich ciśnień na zmiany fenotypowe w zakresie wirulencji i oporności na wybrane antybiotyki oraz na poziom ekspresji genów oporności na antybiotyki u badanych szczepów.
4. Określenie wpływu technologii wysokich ciśnień na przeżywalność oraz możliwość regeneracji komórek *L. monocytogenes*.
5. Określenie wpływu technologii wysokich ciśnień na zdolność do horyzontalnego transferu genów oporności na antybiotyki oraz na częstotliwość tego zjawiska u badanych szczepów.

3. Hipotezy badawcze

Na podstawie wyszczególnionych głównych oraz szczegółowych celów rozprawy doktorskiej sformułowano następujące hipotezy badawcze:

H1. Technologia wysokich ciśnień wywiera złożony wpływ na *L. monocytogenes*, oddziałując na jej przeżywalność, wirulencję oraz antybiotykooporność w sposób zależny od parametrów procesu i właściwości matrycy żywnościowej.

H2. Izolaty *L. monocytogenes* wyizolowane z żywności i środowiska jej produkcji posiadają geny oporności na antybiotyki i wykazują zdolność do horyzontalnego transferu tych genów.

H3. Technologia wysokich ciśnień prowadzi do zmian w fenotypie oporności na antybiotyki i wirulencji szczepów *L. monocytogenes* wyizolowanych z żywności i środowiska jej produkcji poprzez zmiany w ekspresji genów antybiotykooporności i wirulencji.

H4. Technologia wysokich ciśnień wpływa na zmiany częstotliwości transferu genów oporności na antybiotyki.

H5. Subletalne parametry technologii wysokich ciśnień indukują u *L. monocytogenes* przejściowy stan fizjologiczny, prowadzący do czasowych zmian w ekspresji genów związanych z wirulencją i opornością na antybiotyki, które po regeneracji komórek i przywróceniu optymalnych warunków środowiskowych mogą skutkować zmienionym profilem antybiotykooporności.

H6. Skład matrycy żywnościowej moduluje wpływ technologii wysokich ciśnień na przeżywalność, transfer genów oporności i ekspresję genów u *L. monocytogenes*.

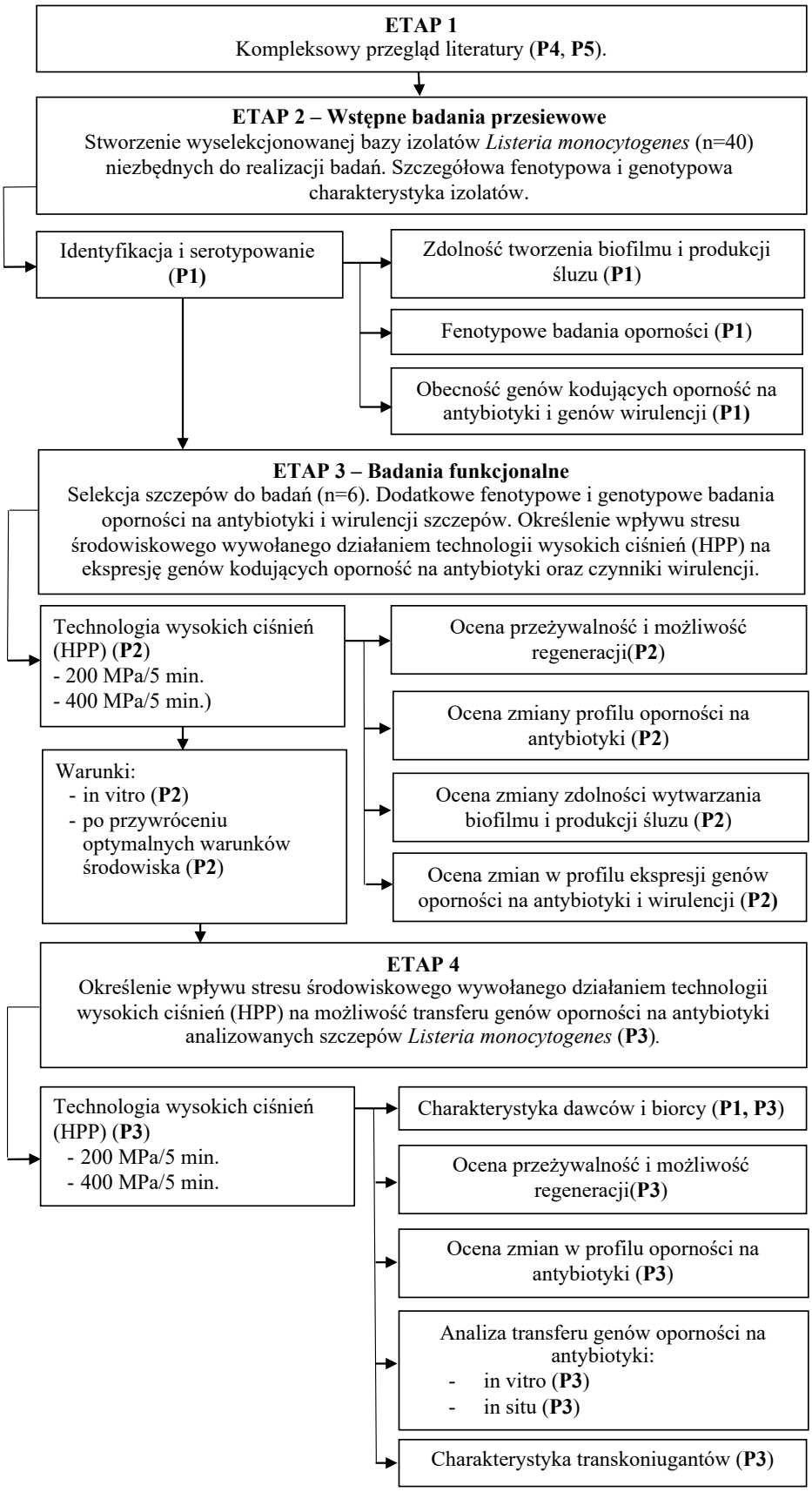
4. Organizacja badań

W niniejszej pracy zastosowano zintegrowane podejście badawcze, obejmujące zarówno analizę literatury, jak i badania eksperymentalne. W pierwszym etapie przeprowadzono usystematyzowaną i krytyczną analizę aktualnego stanu wiedzy dotyczącego wpływu technologii wysokich ciśnień (HPP) na *L. monocytogenes*, ze szczególnym uwzględnieniem zmian w zakresie przeżywalności, wirulencji, oporności na antybiotyki oraz potencjału do horyzontalnego transferu genów. Wyniki tej analizy stanowiły podstawę do sformułowania hipotez badawczych oraz zaprojektowania części eksperymentalnej pracy.

W dalszej części badań zastosowano zintegrowane podejście eksperymentalne, łączące ocenę oporności na antybiotyki oraz potencjału wirulencji *L. monocytogenes*. Przyjęta strategia opierała się na założeniu, że obie cechy mogą być funkcjonalnie powiązane i podlegać modulacji pod wpływem stresów środowiskowych wywołanych obróbką wysokim ciśnieniem. W związku z tym badania zaprojektowano w sposób umożliwiający zarówno określenie występowania genów oporności i wirulencji u badanych izolatów, jak i ocenę ich dalszej odpowiedzi molekularnej w warunkach stresu wywołanego działaniem technologii wysokich ciśnień.

W pierwszym etapie przeprowadzono badania przesiewowe obejmujące fenotypową ocenę oporności na antybiotyki i czynników wirulencji oraz genotypową analizę wybranych genów wirulencji i oporności. Na podstawie uzyskanych wyników wytypowano reprezentatywny podzbiór szczepów (n=6) do dalszych, pogłębionych analiz, skoncentrowanych na ilościowej ocenie ekspresji genów oporności i wirulencji oraz transferze genów oporności w odpowiedzi na stres wywołany działaniem technologii wysokich ciśnień.

Szczegółowy plan badań, uwzględniający poszczególne etapy badań przedstawiono na Rycinie 1.



Rycina 1. Etapy realizacji badań z uwzględnieniem spójnego tematycznie cyklu publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej.

5. Materiały i metody badań

5.1. Identyfikacja izolatów – potwierdzenia rodzajowe i gatunkowe

Badaniom poddano 40 izolatów *L. monocytogenes* pochodzących z kolekcji Katedry Mikrobiologii Żywności, Technologii i Chemii Mięsa (dawna nazwa – Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności), Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Izolaty te zostały wyizolowane z różnych produktów spożywczych oraz ze środowiska produkcji zakładów przemysłu spożywczego w Polsce. Wszystkie izolaty wyizolowano zgodnie z normą 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*, i przechowywano w temperaturze -80°C z zastosowaniem systemu Microbank (PRO-LAB diagnostic, Richmond Hill, ON, Canada). Potwierdzenia na poziomie gatunkowym przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch metod: (1) techniki Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS; Vitek MS, bioMerieux, Francja) – analizy zostały przeprowadzone w 3 niezależnych powtórzeniach (według wytycznych producenta sprzętu, z wykorzystaniem referencyjnego szczepu *Escherichia coli* ATCC®8739, oraz (2) genotypowej metody łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) zgodnie z metodyką opisaną przez Ryu i in. (2013), koncentrując się na obecności genów *prs* oraz *lmo1030*. W tym celu przeprowadzono izolację genomowego DNA z wykorzystaniem zestawu Genomic Mini DNA (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). Uzyskane próbki DNA przechowywano w temperaturze -20°C do dalszych analiz. Uzyskane produkty PCR rozdzielano z wykorzystaniem procesu elektroforezy (100 V/6 min., następnie 80 V/90 min.) w 1,5% żelach agarozowych wybarwionych barwnikiem Midori Green (0,5 µg/ml) (ABO, Polska) stosując bufor 1xTBE. Do wizualizacji zastosowano system do dokumentacji i analizy żeli barwionych fluoroscencyjnie G-BOX F3 (Syngene, UK) **(P1).** Szczegółowa charakterystyka izolatów została przedstawiona w Tabeli S1 (**P1)**.

5.2. Określenie serotypu

Określenie serotypu izolatów przeprowadzono z zastosowaniem techniki Multiplex PCR opisanej w badaniach Nho i in. (2015), stosowanej do klasyfikacji szczepów *L. monocytogenes* do różnych serotypów z linii I – najczęściej występujących w żywności i źródłach związanych z żywnością. Rozdział i wizualizację produktów reakcji PCR przeprowadzono tak, jak opisano w punkcie 5.1 (**P1**)

5.3. Wstępne badania przesiewowe

5.3.1. Ocena czynników wirulencji

5.3.1.1. Zdolność produkcji śluzu

Zdolność produkcji śluzu oceniano na podłożu agarowym z czerwienią Kongo (Congo Red Agar, CRA). Szczepy posiewano na podłoże CRA i inkubowano w 37°C przez 24 godziny, a następnie przechowywano w temperaturze 23 °C przez 48 godzin. Czarne kolonie interpretowano jako wynik dodatni (produkcja śluzu), natomiast kolonie czerwone i ciemnoczerwone jako wynik ujemny (**P1**).

5.3.1.2. Zdolność tworzenia biofilmu

Ocenę mocy tworzenia biofilmu przeprowadzono z wykorzystaniem metody mikropłytkowej (MTP) zgodnie z procedurą zaproponowaną przez Stepanović i in. (2007). Zdolność do tworzenia biofilmu analizowano na sterylnych, polistyrenowych płytkach 96-dołkowych z płaskim dnem, a intensywność biofilmu określano na podstawie pomiaru absorbancji przy długości fali 570 nm z wykorzystaniem czytnika mikropłytek Varioscan LUX (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). Dla każdego izolatu wykonywano pomiary w trzech powtórzeniach, a uzyskane wartości porównywano z wartością odcięcia (ODc), obliczoną jako trzykrotność odchylenia standardowego powyżej średniej absorbancji kontroli negatywnej – bulion Brain Heart Infusion (BHI; Merck, Darmstadt, Germany). Zdolność do tworzenia biofilmu klasyfikowano zgodnie ze skalą Stepanović i in (2007) jako brak, słabą, umiarkowaną lub silną produkcję biofilmu (**P1**).

5.3.1.3. Ocena częstości występowania genów wirulencji

U wszystkich izolatów analizowano obecność genów wirulencji z wykorzystaniem techniki PCR opisanej wcześniej przez Zakrzewski i in. (2020) (**P1**). Wybrano geny wyspy patogeniczności LIPI-1: *prfA*, *hly*, *sigB*, *luxS* i *InlB*. Rozdział i wizualizację produktów reakcji PCR przeprowadzono zgodnie z opisem przedstawionym w punkcie 5.1.

5.3.2. Ocena oporności na antybiotyki

5.3.2.1. Ocena fenotypowej oporności na antybiotyki

Dla wszystkich izolatów przeprowadzono wstępne przesiewowe badania fenotypowe oporności metodą dyfuzyjno-krążkową wg Kirby-Bauera dla panelu 12 antybiotyków (Oxoid,

UK), z 10 klas: aminoglikozydy: gentamycyna (10 μg); beta-laktamy: ampicylina (AMP – 10 μg), penicylina G (P – 1 U); karbapenemy: meropenem (MEM – 10 μg); fluorochinolony: cyprofloksacyna (CIP – 5 μg); linkozamidy: klindamycyna (DA – 2 μg); makrolidy: erytromycyna (E – 15 μg), wankomycyna (VA – 30 μg); fenole: chloramfenikol (C – 30 μg); ryfampicyny: ryfampicyna (RD – 5 μg); sulfonamidy: trimetoprim-sulfametoksazol (SXT – 10 μg); tetracyklina: tetracyklina (TE – 30 μg), na podłożu Mueller-Hinton Agar (Merck, Darmstadt, Germany), zgodnie ze standardami Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości (EUCAST) i Instytutem Norm Klinicznych i Laboratoryjnych (CLSI) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020). Po inkubacji przystąpiono do pomiaru średnic stref zahamowania wzrostu i interpretowano jako „oporne (R), wrażliwe przy zwiększonej ekspozycji (I) lub wrażliwe (S)" przy użyciu standardowych wartości referencyjnych zgodnie z EUCAST dla *L. monocytogenes*. Dodatkowo, ze względu na brak standardów dla antybiotyków nieujętych w EUCAST dla *L. monocytogenes*, zastosowano standardy dla gronkowców, co zapewniło porównywalność interpretacji między testami (**P1**). Etap ten miał na celu szybką identyfikację izolatów wykazujących oporność (R) lub wrażliwość przy zwiększonej ekspozycji (I). Dla izolatów zakwalifikowanych w tym etapie jako R lub I wyznaczono minimalne stężenia hamujące (MICs) za pomocą pasków MTS™ (Liofilchem®, Roseto degli Abruzzi, TE, Włochy). Jako kontrolę jakości zastosowano *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. (**P1**).

5.3.2.2. Ocena genotypowej oporności na antybiotyki

W badaniach przesiewowych (**P1**) obecność genów oporności analizowano wyłącznie w odniesieniu do antybiotyków, wobec których dany izolat wykazał oporność. Obecność genów oporności na antybiotyki analizowano przy użyciu technik PCR. Panel badanych genów obejmował determinanty powszechnie związane z opornością na antybiotyki wykrywane w populacji *L. monocytogenes*: *Lde* (cyprofloksacyna), *aadB* i *aac(3)-IIa (aacC2)* (gentamycyna), *penA* (penicylina G), *lnuA*, *lnuB* i *mefA* (klindamycyna/linkomycyna) oraz *sulI* i *sulII* (trimetoprimu z sulfametoksazolem). Sekwencje starterów, stężenia primerów, parametry procesu i spodziewane długości produktów przedstawiono w Tabeli S2 (**P1**). Reakcje PCR prowadzono z odpowiednimi kontrolami negatywnymi i pozytywnymi oraz markerami wielkości cząsteczkowej produktów reakcji. Rozdział i wizualizację produktów reakcji PCR przeprowadzono tak, jak opisano w punkcie 5.1 (**P1**).

5.4. Badania funkcjonalne

5.4.1. Kryteria wyboru szczepów

W celu wytypowania szczepów do dalszych, szczegółowych badań zastosowano dwuetapowe kryteria selekcji obejmujące: (1) przynależność szczepów do jednego z dwóch dominujących serotypów, tj. 1/2c lub 1/2a, oraz (2) wykazywanie fenotypowej oporności lub wrażliwości przy zwiększonej ekspozycji wobec co najmniej jednego antybiotyku w wyniku przeprowadzenia wstępnych badań przesiewowych. Na podstawie powyższych kryteriów wybrano reprezentatywną liczbę sześciu szczepów reprezentujących zróżnicowanie fenotypowe i genotypowe, które następnie poddano dalszym analizom.

5.4.2. Badania oporności na antybiotyki - wartości minimalnych stężeń hamujących

W pierwszym etapie badań (**P1**) wartości MIC wyznaczano pierwotnie tylko dla antybiotyków, wobec których izolat wykazał oporność w teście przesiewowym. W dalszym etapie badań (**P2**) każdy z sześciu izolatów oceniono względem panelu 6 antybiotyków, w tym dodatkowo włączonych do drugiego etapu badań linkomycyny i fosfomycyny. W rezultacie każdy izolat został scharakteryzowany pod kątem oporności i wartości MIC dla sześciu antybiotyków (TOKU-E; Bellingham, WA, USA): trimetoprimu z sulfametoksazolem, tetracykliny, cyprofloksacyny, klindamycyny, linkomycynę i fosfomycyny. Jako kryteria wyboru antybiotyków do badań przyjęto możliwość zastosowania antybiotyku w leczeniu listeriozy oraz pojawiające się doniesienia o zwiększonej oporności i różnice międzyszczepowe na te antybiotyki wśród *L. monocytogenes*.

Wśród wybranych izolatów wartość MIC oznaczano metodą mikrorozcieńczeń w bulionie, w płytach 96-dołkowych zgodnie z zaleceniami EUCAST (2022) i normą ISO 20776-1:2019 – *Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices.* Part 1: *Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases*. Płytki przygotowywano dodając do każdego dołka 50 µL cation-adjusted Mueller–Hinton broth (Merck, Darmstadt, Niemcy) zawierającego dwukrotną koncentrację roztworu antybiotyku oraz 50 µL zawiesiny inokulum standaryzowanej do 0,5° McFarlanda. Po zamknięciu płytki inkubowano w 35 ± 2 °C przez 20 h. MIC definiowano jako najniższe stężenie antybiotyku, przy którym nie obserwowano widocznego wzrostu, a wyniki

klasyfikowano jako R/I/S według wytycznych EUCAST/CLSI. Jako kontrolę jakości zastosowano *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

Zakresy stężeń antybiotyków użyte w badaniach obejmowały dla linkomycyny 0,125–256 µg/mL, dla fosfomycyny 0,125–256 µg/mL, dla trimetoprimu z sulfametoksazolem 0,0625–32 µg/mL, dla tetracykliny 0,125–64 µg/mL, dla cyprofloksacyny 0,008–16 µg/mL oraz dla klindamycyny 0,0625–32 µg/mL.

5.4.3. Analiza występowania genów oporności na antybiotyki

W drugim etapie badań (**P2**) panel antybiotyków uzupełniono o osiem genów oporności, zgodnych z uzupełnieniem panelu fenotypowych badań oporności: *lin* (linkomycyna), *fosX* (fosfomycyna), *mprF* (modyfikacje błony/czynniki zmniejszające powinowactwo), *sulI* (sulfonamidy), *tetC*, *tetA_1*, *tetA_3* (tetracykliny) oraz *dfrA* (trimetoprim). Obecność genów badano w wyizolowanym genomowym DNA (procedura izolacji zgodna z punktem 5.1.). W każdym izolacie badano obecność genów z wykorzystaniem metody real-time PCR z użyciem starterów i warunków opisanych przez Zakrzewski i in. (2023). Reakcje amplifikacji przeprowadzano w aparacie RotorGene Q (Qiagen Inc., Montreal, ON, Kanada). Program RT-PCR: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min (denaturacja początkowa), 40 cykli (95 °C 15 s; przyłączanie - temp. specyficzna dla każdego genu, 60 s). Swoistość potwierdzano krzywą topnienia 60–95 °C przy przyroście 0,5 °C co 5 s. Wszystkie testy PCR przeprowadzono przy użyciu kontroli pozytywnych i wody wolnej od RNazy jako kontroli negatywnej. Sekwencje starterów i temperatury przyłączania podano w Tabeli S1 (**P2**).

5.4.4. Analiza występowania genów wirulencji

W drugim etapie badań (**P2**) panel genów wirulencji rozszerzono o: *actA* (ruch i rozprzestrzenianie wewnątrzkomórkowe), *plcA* (ucieczka z fagosomu), *plcB* (degradacja błon i rozprzestrzenianie międzykomórkowe), *mpl* (aktywacja fosfolipazy PC-PLC) oraz *osfX* (przeżywalność wewnątrzkomórkowa). Obecność tych genów badano w każdym izolacie z wykorzystaniem metody real-time PCR zgodnie z procedurą omówioną w rozdziale 5.4.3. Sekwencje starterów i temperatury annealingu podano w Tabeli S1 (**P2**).

5.5. Wpływ technologii wysokich ciśnień na odpowiedź komórkową *Listeria monocytogenes*

5.5.1. Technologia wysokich ciśnień

Każdy z analizowanych izolatów *L. monocytogenes* (n=6) poddano działaniu stresu wywołanego działaniem technologii wysokich ciśnień. W tym celu 10 mL 24-godzinnej hodowli bakteryjnej prowadzonej w bulionie Tryptic Soy Broth (TSB; Merck, Darmstadt, Niemcy) przenoszono do butelek z polietylenu o niskiej gęstości (Kautex, Bonn, Niemcy), a następnie poddawano obróbce wysokociśnieniowej. W badaniu zastosowano dwa warianty ciśnienia: 200 MPa oraz 400 MPa, przy czasie ekspozycji wynoszącym 5 minut. Parametry procesu dobrano na podstawie badań wstępnych, aktualnych danych literaturowych oraz z uwzględnieniem potencjalnych zastosowań technologii HPP w przemyśle spożywczym. Wybrano przy tym dwa zakresy parametrów: jeden (200 MPa) umożliwiający przetrwanie komórek *L. monocytogenes* skutkujący jedynie nieznacznym obniżeniem ich liczebności oraz drugi (400 MPa) wywołujący zmiany w stanie fizjologicznym komórek, ale nie doprowadzający do ich śmierci (efekt subletalny). Takie rozwiązanie pozwala jednocześnie ocenić wpływ HPP na przeżywalność patogenu oraz na jego stan fizjologiczny, co jest kluczowe przy ocenie ryzyka i planowaniu zastosowań przemysłowych. Proces prowadzono w roztworze glikolu z wodą (1:1, v/v) z wykorzystaniem jednokomorowego urządzenia wysokociśnieniowego U4040 (IWC PAN, Warszawa, Polska, Unipress Equipment Division) w temperaturze 20 ± 3 °C. Szybkość narastania ciśnienia wynosiła 300 MPa/min, natomiast czas dekompresji był krótszy niż 5 s. Dla każdego izolatu doświadczenia przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach. Po zakończeniu obróbki HPP próbki poddawano dalszym etapom badań, natomiast próbki niepoddane działaniu ciśnienia stanowiły próbę kontrolną (**P2**).

5.5.2. Przeżywalność i możliwość regeneracji

Przeżywalność izolatów *L. monocytogenes* oceniano metodą posiewów płytkowych. Dla każdego izolatu, przed i bezpośrednio po obróbce wysokociśnieniowej, wykonywano serię dziesięciokrotnych rozcieńczeń, a liczbę jednostek tworzących kolonie (*ang*. CFU/mL) oznaczano na podłożu agarowym według Ottaviani and Agosti (ALOA; Merck, Darmstadt, Niemcy) po 48 h inkubacji w temperaturze 37 °C. W przypadku braku wzrostu komórek (poniżej granicy detekcji wykorzystywaną metodą) podejmowano próbę regeneracji zgodnie

z metodyką opisaną przez Valdramidis i in. (2015), z własnymi modyfikacjami. Po stresie wywołanym działaniem wysokich ciśnień 1 mL hodowli przenoszono do świeżego podłoża TSB i inkubowano w temperaturze 30 °C do momentu zaobserwowania wzrostu, który następnie potwierdzano poprzez hodowlę na podłożu Tryptic Soy Agar (TSA; Merck, Darmstadt, Niemcy). Po inkubacji (48 h, 30 °C) wyrosłe kolonie identyfikowano na podłożu ALOA (24 h, 37 °C). Doświadczenia przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach, a po regeneracji izolaty namnażano w świeżym TSB i przeprowadzono dalsze etapy badań (**P2**).

5.5.3. Zmiany profilu oporności na antybiotyki

Po zastosowaniu obróbki wysokich ciśnień przystąpiono do ponownego oznaczania minimalnych stężeń hamujących dla sześciu antybiotyków: linkomycyny, fosfomycyny, trimetoprimu/sulfametoksazolu, tetracykliny, cyprofloksacyny oraz klindamycyny. Zmiany wartości minimalnych stężeń hamujących oceniano bezpośrednio po działaniu stresu wysokociśnieniowego (200 MPa/5 min), po przywróceniu optymalnych warunków wzrostu (hodowla w podłożu o optymalnym składzie i inkubacja w warunkach optymalnych) oraz po regeneracji komórek po ekspozycji na 400 MPa przez 5 minut. Oznaczenia MIC wykonywano metodą mikrorozcieńczeń w bulionie, zgodnie z metodyką opisaną wcześniej w rozdziale 5.4.2.

Odczytu wartości MIC dokonywano po 20 godzinach inkubacji w temperaturze 35 ± 2 °C. Wartość MIC definiowano jako najniższe stężenie antybiotyku, przy którym nie obserwowano widocznego wzrostu bakterii w dołkach płytek do mikrorozcieńczeń. Uzyskane wyniki interpretowano zgodnie z wytycznymi CLSI oraz EUCAST, klasyfikując izolaty jako wrażliwe, wrażliwe przy zwiększonej ekspozycji lub oporne (**P2**).

5.5.4. Zmiany w zdolności wytwarzania śluzu i tworzenia biofilmu

Po obróbce wysokociśnieniowej oceniano zmiany w zdolności izolatów *L. monocytogenes* do tworzenia biofilmu metodą mikropłytek. Zmiany w zdolności do tworzenia biofilmu analizowano bezpośrednio po obróbce HPP, po przywróceniu optymalnych warunków oraz po regeneracji hodowli, na sterylnych, polistyrenowych płytkach 96-dołkowych z płaskim dnem, zgodnie z procedurą zaproponowaną przez Stepanović i in. (2007) opisaną w punkcie 5.3.1.2.

Zmiany zdolności do wytwarzania śluzu oceniano metodą agaru z czerwienią Kongo (CRA) opisaną wcześniej w punkcie 5.3.1.1. Bezpośrednio po obróbce HPP, po przywróceniu optymalnych warunków wzrostu oraz po regeneracji hodowle nanoszono na podłoże CRA

i inkubowano przez 24 h w temperaturze 37 °C, a następnie przechowywano płytki przez 48 h w temperaturze pokojowej (23 °C). Interpretację wyników przeprowadzano na podstawie fenotypu kolonii, przyjmując kolonie czarne jako dodatnie, a czerwone lub ciemnoczerwone jako ujemne w zakresie produkcji śluzu. (**P2**).

5.5.5. Zmiany w profilu ekspresji genów kodujących oporność na antybiotyki i wirulencję

5.5.5.1. Ekstrakcja RNA i odwrotna transkrypcja do cDNA

Całkowite RNA izolowano z wykorzystaniem zestawu Total RNA Mini Plus Kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska). Oczyszczanie oraz koncentrację RNA przeprowadzano zgodnie z zaleceniami producenta przy użyciu zestawu CleanUp RNA Concentrator (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska). Integralność RNA oceniano elektroforetycznie poprzez naniesienie 10 µL próbki na 1,2% żel agarozowy w buforze TBE (0,5×) i prowadzenie rozdziału przy napięciu 90 V przez 1 h. Wizualizację pasm 16S i 23S rRNA przeprowadzano metodą fluorescencyjną z użyciem systemu dokumentacji żeli G-BOX F3 (Syngene, Cambridge, Wielka Brytania). Stężenie oraz czystość RNA oznaczano na podstawie absorbancji przy długościach fal 260 i 280 nm z wykorzystaniem spektrofotometru/fluorymetru DeNovix DS11 FX (DeNovix Inc., Wilmington, NC, USA). Wszystkie próbki RNA zostały natychmiast częściowo poddane odwrotnej transkrypcji, a reszta przechowywana w temperaturze -80 °C. W kolejnym etapie RNA poddawano odwrotnej transkrypcji do cDNA przy użyciu zestawu TranScriba (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska), wykorzystując rekombinowaną odwrotną transkryptazę MMLV, wykazującą optymalną aktywność w zakresie 37–42 °C oraz niską aktywność RNazową. Do syntezy pierwszej nici cDNA stosowano losowe heksamery jako startery, a matrycę RNA zabezpieczano rekombinowanym inhibitorem RNAz (**P2**).

5.5.5.2. Ekspresja genów wirulencji i oporności na antybiotyki

Analizę ekspresji genów przeprowadzono dla piętnastu genów, obejmujących siedem genów wirulencji zlokalizowanych na wyspie patogenności LIPI-1 (*prfA*, *hly*, *actA*, *plcA*, *plcB*, *mpl* oraz *osfX*) oraz osiem genów związanych z opornością na antybiotyki (*lin*, *fosX*, *mprF*, *sulI*, *tetC*, *tetA_1*, *tetA_3*, *dfrA*). Reakcje ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR) wykonywano fluorometrycznie z użyciem barwnika SYBR Green (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) w trzech niezależnych powtórzeniach, wykorzystując system Rotor-Gene

Q (Qiagen Inc., Montreal, Kanada), zgodnie z metodyką opisaną wcześniej przez Zakrzewskiego i in. (2023). Mieszanina reakcyjna (objętość końcowa 10 µL) zawierała 5 µL PowerUp SYBR Green Master Mix, 1 µL mieszaniny starterów (starter przedni (forward) i wsteczny (reverse); 800 nM/µL) oraz 1 µL matrycy cDNA, uzupełnionej wodą dejonizowaną. Warunki amplifikacji były następujące: 50 °C przez 2 min, wstępna denaturacja w temperaturze 95 °C przez 10 min, a następnie 40 cykli składających się z denaturacji (95 °C, 15 s) oraz etapu przyłączania starterów i elongacji (60 s) w temperaturze specyficznej dla analizowanego genu. Sekwencje starterów oraz temperatury przyłączania przedstawiono w Tabeli S1 (**P2**). Specyficzność amplifikacji weryfikowano na podstawie krzywych topnienia, uzyskanych poprzez stopniowe podgrzewanie próbek w zakresie 60–95 °C (przyrost 0,5 °C co 5 s). Jako gen referencyjny zastosowano gen kodujący 16S rRNA, który wykazuje stabilność pod wpływem HPP. Analizę różnic w ekspresji genów przeprowadzono metodą względnej kwantyfikacji zgodnie z modelem matematycznym Pfaffla (2001), normalizując poziom ekspresji do genu referencyjnego. Za istotny wzrost ekspresji uznawano wartości ilorazu ekspresji ≥2,0, natomiast za istotny spadek - wartości ≤0,5 (**P2**).

5.6. Analiza transferu genów oporności na antybiotyki

5.6.1. Charakterystyka szczepów – dawcy i biorca

Wybrane i scharakteryzowane szczepy *L. monocytogenes* (n=6) wybrano jako dawców do analiz transferu genów oporności na antybiotyki.

W pierwszym etapie analiz przetestowano izolaty dawców w celu ustalenia, czy zidentyfikowane geny oporności na antybiotyki we wcześniejszych badaniach były zlokalizowane w chromosomach czy na plazmidach. W tym celu powtórzono reakcje PCR i PCR w czasie rzeczywistym dla badanych genów oporności, z wykorzystaniem techniki PCR oraz techniki real-time PCR, dokładnie tak jak w punkcie 5.4.3. wykorzystując jako matrycę plazmidowe DNA. Zgodnie z instrukcjami producenta DNA plazmidowe wyizolowano ze szczepów przy użyciu zestawu Plasmid Mini DNA Isolation kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). Negatywny wynik (brak pasma w przypadku reakcji PCR i brak wzrostu fluorescencji w przypadku PCR w czasie rzeczywistym) wskazywał na lokalizację chromosomową genu. W niniejszym badaniu analizowano wyłącznie transfer genów zlokalizowanych na plazmidach u analizowanych izolatów (**P3**).

Jako biorcę zastosowano standardowy szczep *Enterococcus faecalis* JH2-2 (LMG 19456) wykorzystywany powszechnie w badaniach transferu genów. Szczep ten jest wolny od

plazmidów i charakteryzuje się fenotypową opornością na rifampicynę i kwas fusydowy (MIC > 256 μg/mL). Szczep poddano dodatkowej charakterystyce oporności wobec pięciu badanych antybiotyków: tetracykliny, linkomycyny, cyprofloksacyny, fosfomycyny i klindamycyny metodą mikrorozcieńczeń w bulionie zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 5.4.2. Donory oraz szczep biorcy przechowywano z zastosowaniem systemu Microbank (PRO-LAB diagnostic, Richmond Hill, ON, Canada) w −80 °C do czasu analizy. Izolaty hodowano w TSB (Merck, Darmstadt, Germany) w 37 °C przez 24 h, następnie pojedyncze kolonie hodowano na TSA (Merck, Darmstadt, Germany) i inkubowano w tych samych warunkach. Uzyskane hodowle wykorzystano do dalszych badań (**P3**).

5.6.2. Analiza wpływu technologii wysokich ciśnień na transfer genów oporności w warunkach in vitro i in situ

5.6.2.1. Technologia wysokich ciśnień

Każdy z analizowanych szczepów dawców (n=6) poddano działaniu technologii wysokich ciśnień w dwóch wariantach ciśnienia (200 MPa/5 minut oraz 400 MPa/5 minut) zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 5.5.1. Badania transferu genów oporności przeprowadzano zarówno w warunkach in vitro, jak in situ. 10 ml 24-godzinnej hodowli każdego izolatu w bulionie BHI (Merck, Darmstadt, Niemcy) (badania in vitro) oraz 10 ml 24-godzinnej hodowli każdego izolatu analizowanego w soku z marchwi (Vital Fresh, Polska) (badania in situ) przeniesiono do butelki z polietylenu o niskiej gęstości (Kautex, Bonn, Niemcy) i poddano obróbce HPP. Jako kontrolę wykorzystano próbki niepoddane obróbce HPP. Dla każdego badanego izolatu przeprowadzono trzy niezależne powtórzenia. Po obróbce HPP przeprowadzono kolejne etapy badania.

5.6.2.2. Analiza przeżywalności i regeneracji po obróbce HPP

Przeżywalność badanych szczepów oceniano w dwóch wariantach: in vitro (w pożywce mikrobiologicznej, którą stanowiło podłoże BHI) oraz in situ (w matrycy żywnościowej – soku z marchwi), zgodnie z opisem przedstawionym w punkcie 5.5.2. Próbki przed i bezpośrednio po zabiegu HPP poddawano seryjnym rozcieńczeniom i oznaczano liczebność metodą płytkową. Poszczególne rozcieńczenia nanoszono na podłoże ALOA (Merck, Darmstadt, Germany). Płytki inkubowano (37 °C; 46 h), a następnie liczono wyrosłe kolonie, wyrażając wynik w CFU/mL. Każdy pomiar prowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach. Próbki poddane ciśnieniu 400 MPa, w których liczba komórek spadła poniżej progu detekcji,

poddawano procesowi regeneracji przed dalszymi analizami. 1 mL każdej hodowli przenoszono do świeżego TSB (in vitro) lub do soku z marchwi (in situ) i inkubowano w 30 °C, monitorując wzrost izolatów codziennie aż do pełnej regeneracji. Próbkę posiewano na podłoże TSA i inkubowano 48 h w 30 °C (w trzech powtórzeniach). Dla potwierdzenia tożsamości wybierano 5 losowych kolonii, które posiewano na podłoże ALOA i inkubowano 24 h w 37 °C. Analizy powtórzono trzykrotnie. Po odzyskaniu izolaty hodowano ponownie w świeżym TSB i niezwłocznie poddawano kolejnym etapom analizy (**P3**).

5.6.2.3. Zmiana profilu oporności na antybiotyki

Po zastosowaniu HPP oznaczano wartości MIC dla pięciu antybiotyków: linkomycyny, fosfomycyny, tetracykliny, cyprofoksacyny oraz klindamycyny. Pomiar wykonano bezpośrednio po ekspozycji 200 MPa/5 min oraz po regeneracji komórek po ekspozycji 400 MPa/5 min. Wartości MIC określono metodą mikrorozcieńczeń zgodnie z opisem przedstawionym w punkcie 5.4.2. Interpretację wyników przeprowadzono na podstawie wytycznych EUCAST i CLSI, klasyfikując izolat jako S, I lub R (**P3**).

5.6.2.4. Analiza transferu genów oporności na antybiotyki

W badaniu analizowano transfer siedmiu genów oporności kodujących oporność na pięć grup antybiotyków: tetracykliny (*tetA_1*, *tetA_3*, *tetC*), linkomycynę (*lin*), cyprofloksacynę (*Lde*), fosfomycynę (*fosX*) oraz klindamycynę (*lnuA*). Do analiz włączono wyłącznie izolaty posiadające geny oporności zlokalizowane na plazmidach.

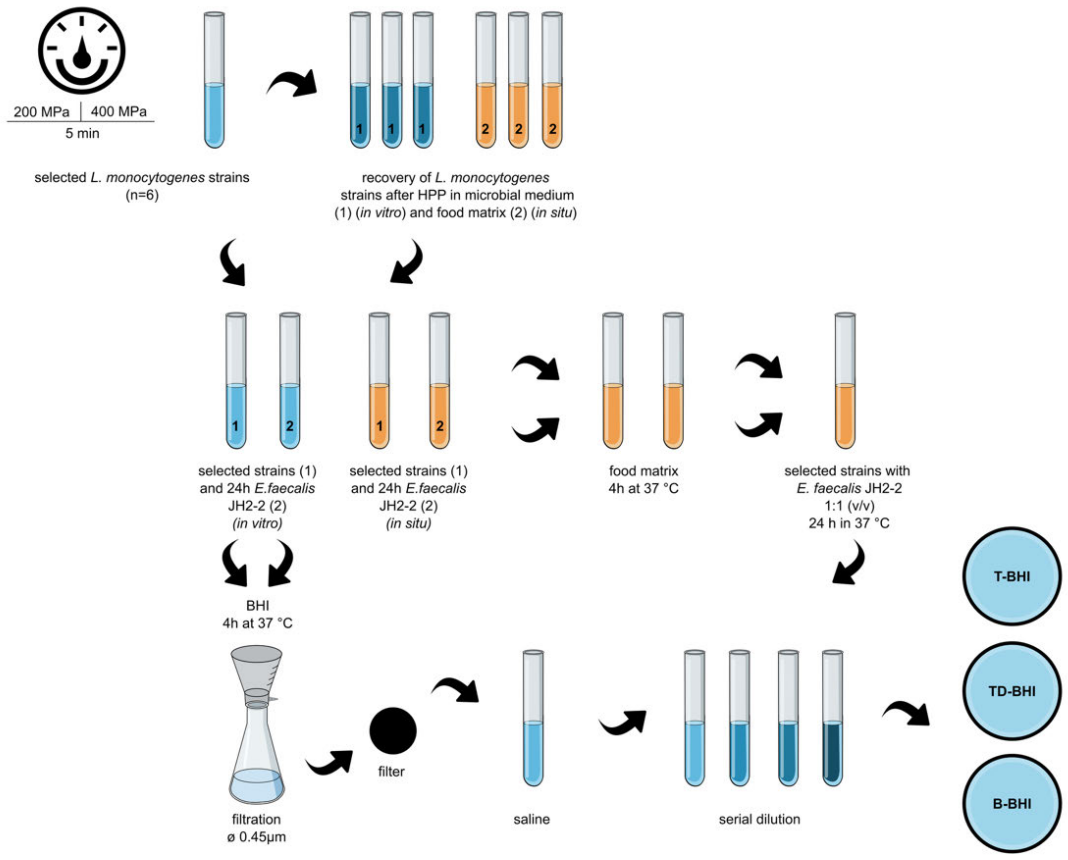
5.6.2.4.1. Transfer genów in vitro

Transfer genów przeprowadzono metodą filtrów membranowych. Jako dawców zastosowano szczepy *L. monocytogenes* poddane obróbce HPP w pożywce mikrobiologicznej (200 MPa/5 min) oraz szczepy po regeneracji komórek po ekspozycji 400 MPa/5 min. Szczep *E. faecalis* JH2-2 wykorzystano jako biorcę. Donory niepoddane działaniu HPP stanowiły kontrolę transferu. Procedurę przeprowadzono zgodnie ze schematem opisanym we wcześniejszych badaniach (Wiśniewski i in., 2024), z modyfikacjami obejmującymi etap regeneracji po HPP (Rycina 2). W badaniu wykorzystano trzy rodzaje stałych pożywek mikrobiologicznych: pierwszą dla transkoniugantów (T-BHI), zawierającą 100 µg/ml kwasu fusydowego, 50 µg/ml ryfampicyny i odpowiednie stężenie antybiotyku kodowanego przez gen, dla którego przeprowadzono transfer; drugą dla dawcy (TD-BHI), zawierający tylko

odpowiednie stężenie antybiotyku, na który odporność jest kodowana przez gen, dla którego przeprowadzono transfer; trzecią dla biorców (B-BHI), zawierający 100 µg/ml kwasu fusydowego i 50 µg/ml ryfampicyny. Aby wykluczyć możliwość transformacji, do płytek dodano DNazę I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (100 µg/ml). Wyniki transferu zostały przedstawione i zdefiniowane jako częstotliwość transferu, tj. iloraz liczby transkoniugantów (CFU/mL) i liczby komórek dawcy (**P3**).

5.6.2.4.2. Transfer genów in situ

Transfer genów w warunkach zbliżonych do rzeczywistych oceniano w matrycy żywnościowej, którą stanowił sok z marchwi. Jako dawców zastosowano szczepy po obróbce HPP w soku z marchwi (200 MPa/5 min) oraz szczepy po regeneracji po ekspozycji 400 MPa/5 min. Szczep *E. faecalis* JH2-2 zastosowano jako biorcę. Donory nieeksponowane na HPP zastosowano jako kontrolę. Transfer przeprowadzono zgodnie z tym samym schematem co w wariancie in vitro (Rycina 2), stosując dziesięciokrotne rozcieńczenia i inokulację na wcześniej scharakteryzowane podłoża T-BHI, TD-BHI oraz B-BHI (**P3**).



Rycina 2. Schemat procedury badania transferu genów oporności na antybiotyki (**P3**).

5.6.2.4.3. Charakterystyka transkoniugantów

Transkoniuganty poddano analizie fenotypowej i molekularnej. Oporność na badane antybiotyki określano przez wyznaczenie wartości MIC zgodnie z opisem przedstawionym w punkcie 5.4.2.

Dla potwierdzenia transferu wykonano izolację DNA genomowego oraz plazmidowego przy użyciu zestawów Genomic Mini kit i Plasmid Mini DNA kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). Obecność analizowanych genów oporności badano metodami PCR oraz real-time PCR zgodnie z opisami przedstawionymi w punkcie 5.3.2.2 i 5.4.3.

Wszystkie uzyskane transkoniuganty genotypowano metodą ERIC–PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - Polymerase Chain Reaction) zgodnie z Zarzecką i in. (2022). Reakcję ERIC-PCR przeprowadzono w mieszaninie o objętości 25 µL zawierającej: 12,5 µL DreamTaq Green PCR Master Mix (2×) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1,25 µL (10 pmol) każdego startera, 8,5 µL ddH_2O oraz 1,5 µL matrycowego DNA. Amplifikacje prowadzono w termocyklerze Mastercycler nexus GX2 (Eppendorf, Hamburg, Niemcy). Produkty PCR rozdzielono metodą elektroforezy na żelu agarozowym 1,5% i zobrazowano systemem G-BOX F3 (Syngene, Cambridge, Wielka Brytania).

Dla potwierdzenia tożsamości gatunkowej uzyskanych transkoniugantów przeprowadzono dodatkowo analizy genotypowe metodą PCR oraz identyfikację z wykorzystaniem techniki MALDI-TOF MS, zgodnie z procedurami opisanymi przez Chajęcką-Wierzchowską i in. (2021). Transkoniuganty wysiewano na podłoże TSA (Merck, Darmstadt, Niemcy) i inkubowano w temperaturze 37 °C przez 18-24 h.

Do badań genotypowych wyizolowano całkowite DNA genomowe z wykorzystaniem zestawu Genomic Mini DNA isolation kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska), zgodnie z instrukcją producenta. Uzyskane DNA zawieszano w buforze Tris-HCl (10 mM, pH 8,5) i przechowywano w temperaturze –20 °C do momentu przeprowadzenia reakcji PCR. Izolowane DNA stanowiło matrycę do amplifikacji fragmentów specyficznych dla rodzaju *Enterococcus*. Reakcje PCR prowadzono w termocyklerze Mastercycler nexus GX2 (Eppendorf, Hamburg, Niemcy), a produkty amplifikacji analizowano metodą elektroforezy w żelu agarozowym zgodnie z metodyką opisaną przez Chajęcką-Wierzchowską i in. (2021). W każdej serii reakcji stosowano odpowiednie kontrole pozytywne i negatywne.

Równolegle przeprowadzano identyfikację transkoniugantów metodą MALDI-TOF MS. Do analizy wykorzystano pojedyncze kolonie wyhodowane na TSA po nocnej inkubacji w 37 °C. Materiał biologiczny nanoszono bezpośrednio na płytkę pomiarową, pokrywano 1 µL

matrycy (α-cyano-4-hydroksycynamonowy kwas) i pozostawiano do całkowitego wyschnięcia. Analizę widm masowych prowadzono przy użyciu systemu VITEK® MS (bioMérieux), a uzyskane widma porównywano z biblioteką referencyjną producenta. Identyfikację uznawano za wiarygodną, jeżeli wynik spełniał kryteria akceptacji systemu na poziomie rodzaju lub gatunku. W przypadkach niejednoznacznych lub rozbieżnych wyników analizy MALDI-TOF MS, identyfikację powtarzano lub potwierdzano na podstawie wyników analiz genotypowych.

Profile ERIC-PCR porównano z profilem szczepu biorczego *E. faecalis* JH2-2 w celu wykluczenia kontaminacji. Zgodność profili wskazywała na pochodzenie transkoniugantów od biorcy. Analizę klastrową przeprowadzono w programie BioNumerics v.7.6.3 (Applied Maths/bioMérieux). Odległości podobieństwa wyliczono współczynnikiem Dice, a dendrogram skonstruowano metodą nieobciążonego łączenia średnich (UPGMA) (**P3**).

5.7. Analizy statystyczne

Przeprowadzono analizy statystyczne w celu oceny różnic i zależności między warunkami eksperymentalnymi. Normalność danych oceniono za pomocą testu Shapiro-Wilka. Ze względu na to, że dane nie miały rozkładu normalnego ($p < 0,05$), zastosowano testy nieparametryczne. Różnice w częstotliwości transferu genów oporności między warunkami ciśnienia analizowano za pomocą ANOVA Friedmana, natomiast porównania między antybiotykami w tych samych warunkach przeprowadzono za pomocą testu Kruskala-Wallisa. Związki między warunkami ciśnienia a częstotliwością transferu genów oceniono za pomocą współczynnika korelacji rang Spearmana. W celu scharakteryzowania szczepów dane jakościowe analizowano za pomocą testu chi-kwadrat (χ^2), a gdy oczekiwana liczba komórek była <5, zastosowano test dokładny Fishera. Istotność statystyczną ustalono na poziomie $p < 0,05$. Analizy przeprowadzono przy użyciu programów PQStat v. 1.8.6 (PQStat Software, Poznań, Polska) i Statistica 13.3 (StatSoft® Inc., Tulsa, OK, USA).

Szczegóły opisu zastosowanych metod badawczych przedstawiono w 3 publikacjach, będących podstawą niniejszej rozprawy:

P1. Wiśniewski, P., Zakrzewski, A. J., Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W. (2022). Antimicrobial Resistance and Virulence Characterization of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Food and Food Processing Environments. *Pathogens*, 11, 1099. https://doi.org/10.3390/pathogens11101099.

P2. Wiśniewski, P., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2023). High-Pressure Processing – Impacts on the Virulence and Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolated from Food and Food Processing Environments. *Foods*, 12, 3899. https://doi.org/10.3390/foods12213899.

P3. Wiśniewski, P., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2024). High-Pressure Processing Influences Antibiotic Resistance Gene Transfer in *Listeria monocytogenes* Isolated from Food and Processing Environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 25, 12964. https://doi.org/10.3390/ijms252312964.

6. Wyniki

6.1. Charakterystyka izolatów – identyfikacja i określenie serotypu

Przynależność rodzajową i gatunkową badanych izolatów potwierdzono za pomocą spektrometrii mas MALDI-TOF MS oraz techniki PCR ukierunkowanej na geny *prs* (na poziomie rodzaju) i *lmo1030* (na poziomie gatunku). Zastosowanie MALDI-TOF MS było uzasadnione koniecznością weryfikacji i doprecyzowania identyfikacji izolatów z wykorzystaniem nowszych, bardziej precyzyjnych metod, niedostępnych w momencie tworzenia kolekcji. Tak przeprowadzona weryfikacja pozwoliła wykluczyć wyniki fałszywie dodatnie i stanowiła niezbędny punkt wyjścia do analizy zróżnicowania serotypowego (**P1**).

Przeprowadzona analiza serotypowania wykazała istotne (p = 0,0009) zróżnicowanie serotypowe badanych izolatów *L. monocytogenes* w zależności od źródła ich pochodzenia. Wśród szczepów wyizolowanych z żywności dominował serotyp 1/2a (n=18; 66,7%), natomiast w przypadku izolatów pochodzących ze środowiska przetwórstwa żywności najczęściej identyfikowano serotyp 1/2c (n=7; 53,8%). Stwierdzono również obecność serotypów 3a i 3c, co potwierdza różnorodność genetyczną badanej populacji. Trzy szczepy wyizolowane z żywności nie zostały przypisane do linii I.

6.2. Wyniki badań przesiewowych

Badania przesiewowe posłużyły jako etap selekcji izolatów o najbardziej reprezentatywnych profilach wirulencji i oporności do dalszych analiz funkcjonalnych (**P1**).

6.2.1. Ocena czynników wirulencji

6.2.1.1. Zdolność tworzenia biofilmu i wytwarzania śluzu

Ocena zdolności tworzenia biofilmu metodą MTP wykazała ograniczoną liczbę silnych producentów biofilmu. Tylko dwa izolaty z żywności (7,4%) oraz jeden ze środowiska produkcji żywności (7,6%) wykazywały silną zdolność jego tworzenia. Umiarkowaną zdolność produkcji biofilmu stwierdzono u czterech szczepów pochodzących z obu źródeł (odpowiednio 14,8% oraz 30,8%), natomiast słabą u jednego izolatu z żywności i pięciu izolatów środowiskowych (odpowiednio 3,7% i 38,5%). Analiza statystyczna potwierdziła istotny wpływ źródła izolacji na zdolność tworzenia biofilmu (p = 0,0022) (**Tabela 1 – P1**).

W przeciwieństwie do wyników dotyczących biofilmu, nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy źródłem izolacji a zdolnością do produkcji śluzu (p = 0,1435) ani opornością na środki przeciwdrobnoustrojowe (p = 0,6972). W teście CRA jedynie cztery szczepy (14,8%) pochodzące z żywności wykazywały zdolność produkcji śluzu, podczas gdy żaden z izolatów środowiskowych nie wykazał tej cechy.

6.2.1.2. Ocena obecności genów wirulencji

Analiza czynników wirulencji wykazała, że wszystkie badane izolaty posiadały geny *prfA* oraz *hly* należące do wyspy patogeniczności LIPI-1. Gen *inlB* był najczęściej wykrywanym dodatkowym determinantem wirulencji wśród izolatów z żywności (n=26; 96,3%), natomiast u szczepów pochodzących ze środowiska produkcji żywności stwierdzono jednoczesną obecność genów *inlB*, *luxS* oraz *sigB* u wszystkich analizowanych szczepów (**Tabela 1 – P1**).

6.2.2. Ocena oporności na antybiotyki

6.2.2.1. Ocena fenotypowej oporności

Analiza fenotypowej oporności na antybiotyki wykazała, że 37 spośród 40 badanych izolatów (92,5%) było opornych lub wykazywało wrażliwość przy zwiększonej ekspozycji (I) na co najmniej jeden z testowanych antybiotyków (**Tabela 2 – P1**). Wszystkie analizowane szczepy pozostawały wrażliwe na ampicylinę, chloramfenikol, erytromycynę, rifampicynę, tetracyklinę oraz wankomycynę. Najczęściej obserwowano oporność lub wrażliwość przy zwiększonej ekspozycji na klindamycynę. Był to najczęściej obserwowany profil oporności spośród siedmiu zidentyfikowanych (**Tabela 3 – P1**).

Wśród izolatów pochodzących z żywności stwierdzono dodatkowo oporność na meropenem (n=1; 3,7%) oraz trimetoprim/sulfametoksazol (n=2, 7,4%), a także wrażliwość przy zwiększonej ekspozycji na cyprofloksacynę (n=2; 7,4%) i gentamycynę (n=1, 3,7%). Izolaty ze środowiska produkcji żywności wykazywały oporność na penicylinę G (n=1; 7,7%) oraz trimetoprim/sulfametoksazol (n=3, 23,1%) (**Tabela 2 – P1**)

Szczegółowa analiza oporności na antybiotyki wykazała występowanie siedmiu różnych wzorców oporności (**Tabela 3 – P1**). Większość izolatów zarówno z żywności (n=20, 74,0%) oraz środowiska produkcji żywności (n=10, 77,0%) wykazywała oporność lub wrażliwość przy zwiększonej ekspozycji wyłącznie wobec jednego antybiotyku. Tylko jeden izolat z żywności (3,7%) wykazał fenotyp wieloooporności.

6.2.2.2. Ocena genotypowej oporności

Izolaty wykazujące fenotypową oporność lub wrażliwość przy zwiększonej ekspozycji poddano analizie molekularnej w celu identyfikacji genów oporności (**Tabela 4 – P1**). Gen oporności na cyprofloksacynę (*lde*) oraz gen oporności na gentamycynę (*aadB*) wykryto u wszystkich izolatów wykazujących fenotypową oporność na te antybiotyki. W przypadku cyprofloksacyny wartości MIC wśród izolatów z żywności mieściły się w zakresie 0,38–0,50 µg/mL, co odpowiadało fenotypowi pośredniemu stwierdzonemu u 2 (7,4%) izolatów. Dla gentamycyny odnotowano pojedynczy izolat o fenotypie I (3,7%) z wartością MIC równą 0,19 µg/mL.

W przypadku oporności na trimpetoprim/sulfametoksazol gen *sulI* stwierdzono u 4 z 5 (80,0%) badanych izolatów, natomiast *sulII* jedynie u 2 (40,0%). Wartości MIC dla trimetoprimu/sulfametoksazolu wśród izolatów opornych wynosiły 0,064 µg/mL w grupie izolatów z żywności oraz 0,064–0,125 µg/mL wśród izolatów środowiskowych.

Geny związane z opornością na klindamycynę wykryto u 42,9% analizowanych szczepów (n=15). Najczęściej identyfikowano gen *lnuA* (n=13, 37,2%), rzadziej *mefA* (n=9, 25,8%), natomiast genów *lnuB*, *penA* oraz *aac(3)-IIa (aacC2)a* nie stwierdzono u żadnego z izolatów (**P1, Tabela 4**). Wśród izolatów wykazujących oporności na klindamycynę wyróżniono trzy różne wzorce genotypowe (**P1, Tabela 5**). Analiza wartości MIC dla klindamycyny wykazała szeroki zakres zmienności: wśród izolatów z żywności (1,0–32,0 µg/mL), natomiast wśród izolatów ze środowiska produkcji żywności wartości te mieściły się w granicach 1,5–4,0 µg/mL. Wysokie wartości MIC korespondowały z obserwowanym wysokim odsetkiem fenotypów I (n=23; 57,5%) oraz R (n=12; 30,0%). Ponadto w przypadku meropenemu stwierdzono pojedynczy izolat oporny pochodzący z żywności (3,7%) z wartością MIC równą 0,047 µg/mL. Dla pozostałych antybiotyków nie odnotowano wartości MIC przekraczających przyjęte punkty odcięcia, a wszystkie izolaty sklasyfikowano jako wrażliwe.

Ogółem badane determinanty oporności wykryto u 15 izolatów (55,6%) pochodzących z żywności oraz u 4 izolatów (30,8%) ze środowiska produkcji żywności. Osiem opornych izolatów z żywności (50,0%) oraz dwa oporne izolaty środowiskowe (40.0%) posiadały tylko jeden z analizowanych genów oporności (**P1**).

6.3. Wyniki badań funkcjonalnych

Do dalszych analiz wpływu czynników stresowych na odpowiedź komórkową *L. monocytogenes* wyselekcjonowano 6 szczepów (oznaczonych kolejno **Lm_1, Lm_2, Lm_3,**

Lm_4, Lm_5, Lm_6) o serotypach 1/2a i 1/2c, wykazujące fenotypową oporność lub wrażliwość przy zwiększonej ekspozycji wobec co najmniej jednego antybiotyku (Tabela 2).

Tabela 2. Charakterystyka szczepów *L. monocytogenes* (n=6) wybranych do badań funkcjonalnych (**P2** – **Tabela 1**).

Szczep		**Serotyp**	**Źródło izolacji**	**Biofilm**	**Śluz**	**LIPI-1**	**Wartości MIC [µg/ml]**	**Geny oporności na antybiotyki**
Lm_1	168	1/2c	Odpływ podłogowy	Silny	Brak	*hly prfA*	DA – 2 (I)	*lnuA*
Lm_2	165		Odpływ podłogowy	Słaby			P – 1 (R) SXT – 0.125 (R)	*mefA, sulI*
Lm_3	177		Linia produkcyjna	Słaby			DA – 1 (I) SXT – 0.064 (R)	*sulI, sulII*
Lm_4	92	1/2a	Sok	Silny			DA – 2 (R) MEM – 0.047 (R) SXT (R) – 0.064 (R)	*sulI*
Lm_5	167		Odpływ podłogowy	Umiarkowany			DA – 1.5 (I)	-
Lm_6	148		Mrożone warzywa	Brak			CN – 0.19 (I) SXT – 0.064 (R)	*aadB, mefA, lnuA, sulII*

LIPI-1 – wyspa patogenności Listeria-1; MIC – minimalne stężenie hamujące; I – wrażliwy przy zwiększonej ekspozycji, R – oporność; DA – klindamycyna, CN – gentamycyna, MEM – meropenem, P – penicylina, SXT – trimetoprim/sulfametoksazol

6.3.1. Badania oporności na antybiotyki wyselekcjonowanych szczepów

Na początku badań funkcjonalnych oznaczono minimalne stężenia hamujące u wszystkich szczepów dla sześciu antybiotyków: linkomycyny, fosfomycyny, trimetoprimu/sulfametoksazolu, tetracykliny, cyprofloksacyny oraz klindamycyny. Wartości wyjściowe MIC były zróżnicowane pomiędzy analizowanymi szczepami. Zakres obserwowanych wartości MIC obejmował wartości od <0,0625 µg/mL do >256 µg/mL, co ilustruje zróżnicowanie wrażliwości wśród badanych szczepów. Najwyższe wartości MIC odnotowano dla fosfomycyny i linkomycyny – szczepy Lm_1 i Lm_2 wykazywały znacząco podwyższone MIC dla fosfomycyny (odpowiednio 256 µg/mL i >256 µg/mL) oraz podwyższone wartości MIC dla linkomycyny (16 µg/mL i 8 µg/mL), podczas gdy u innych szczepów wartości MIC dla tych antybiotyków mieściły się w zakresie interpretowanym jako

wrażliwość lub wrażliwość przy zwiększonej ekspozycji. Oporność na trimetoprim/sulfametoksazol odnotowano u 4 szczepów (Lm_2, Lm_3, Lm_4 i Lm_6).

Wartości MIC dla trimetoprimu/sulfametoksazolu wśród szczepów mieściły się w przedziale 0,0625–0,125 µg/mL. W przeciwieństwie do tego, wartości MIC dla tetracykliny i cyprofloksacyny u wszystkich analizowanych szczepów mieściły się w przedziale odpowiednio 0,125–0,5 µg/mL i 0,125–0,25 µg/mL, wskazując na fenotyp wrażliwości. Pięć z sześciu izolatów wykazywało wartości MIC dla klindamycyny klasyfikujące szczepy jako wrażliwe.

6.3.2. Analiza genów oporności i wirulencji

Analiza genotypowa przeprowadzona w drugim etapie badań (**P2**) wykazała, że każdy z sześciu szczepów posiadał pełen panel analizowanych determinantów genetycznych związanych z opornością odpowiednio na: linkomycynę (*lin*), fosfomycynę (*fosX*), trimetoprim/sulfametoksazol (*sulI*) oraz tetracyklinę (*tetC, tetA_1, tetA_3*) , a także gen związany z modyfikacjami błony komórkowej wpływającymi na zmniejszenie powinowactwa do antybiotyków (*mprF*) oraz gen *dfrA*.

Równolegle przeprowadzona analiza genów wirulencji wykazała, że wszystkie szczepy posiadały również pełen panel genów wirulencji analizowanych w drugim etapie badań, obejmujący *actA, plcA, plcB, mpl* oraz *osfX*. Geny te, związane odpowiednio z ruchem i rozprzestrzenianiem wewnątrzkomórkowym (*actA*), ucieczką z fagosomu (*plcA*), degradacją błon i szerzeniem się międzykomórkowym (*plcB*), aktywacją fosfolipazy PC-PLC (*mpl*) oraz przeżywalnością wewnątrzkomórkową (*osfX*), pełnią kluczową rolę w patogenezie *L. monocytogenes*.

6.4. Wpływ technologii wysokich ciśnień na odpowiedź komórkową szczepów *L. monocytogenes*

6.4.1. Wpływ na przeżywalność i regenerację szczepów

Stwierdzono zróżnicowaną przeżywalność analizowanych szczepów *L. monocytogenes* pod wpływem HPP w zależności od zastosowanych warunków procesu i środowiska (**P2, Tabela 2 – P2; Tabele 2, 3 – P3**). Ciśnienie 200 MPa nie spowodowało istotnej redukcji liczby komórek ani w warunkach in vitro (pożywka BHI), ani in situ (sok z marchwi) – liczba jednostek tworzących kolonie (CFU/mL) pozostała na poziomie zbliżonym do kontroli. Natomiast ciśnienie 400 MPa w warunkach in vitro wpłynęło na redukcję liczby wszystkich

badanych szczepów poniżej progu detekcji (<10 CFU/mL). W soku z marchwi (in situ) zaobserwowano działanie ochronne matrycy żywnościowej – w przypadku trzech z sześciu szczepów (50,0%; Lm_4, Lm_5, Lm_6) odnotowano wzrost komórek. Szczepy, których populacja spadła poniżej progu detekcji, wymagały etapu regeneracji przed dalszymi analizami. Stwierdzono zdolność regeneracji wszystkich szczepów po 72 godzinach zarówno w warunkach in vitro jak in situ.

6.4.2. Wpływ na zmiany fenotypu oporności na antybiotyki

Technologia wysokich ciśnień miała znaczący wpływ na zmiany fenotypu oporności na antybiotyki u analizowanych szczepów *L. monocytogenes*, wywołując wyraźny wzrost wartości MIC w porównaniu ze szczepami kontrolnymi. Charakter oraz skala tych zmian były zależne od zastosowanego poziomu ciśnienia, a w wielu przypadkach utrzymywały się również po przywróceniu optymalnych warunków wzrostu (**Rycina 1 – P2**).

W przypadku działania niższego poziomu ciśnienia (200 MPa) odnotowano zróżnicowaną odpowiedź badanych szczepów, zależną od rodzaju antybiotyku. Najbardziej spójne zmiany dotyczyły tetracykliny, dla której wszystkie analizowane izolaty wykazały wzrost wartości MIC, co świadczy o silnej presji selekcyjnej wywołanej przez HPP. Wyraźne zwiększenie wartości MIC obserwowano również dla fosfomycyny, cyprofloksacyny oraz linkomycyny, przy czym w przypadku tych antybiotyków zmiany obejmowały większość badanych szczepów. Umiarkowane zmiany dotyczyły trimetoprimu/sulfametoksazolu, natomiast najmniejszy wpływ odnotowano dla klindamycyny.

Zastosowanie wyższego poziomu ciśnienia (400 MPa) prowadziło do bardziej wyraźnych zmian w profilach oporności. Wzrost wartości MIC był bardziej nasilony, szczególnie w przypadku linkomycyny i cyprofloksacyny. Podobnie jak przy niższym ciśnieniu, wszystkie izolaty wykazywały zwiększoną wartość MIC dla tetracykliny, co potwierdza wysoką podatność szczepów na zmiany oporności na ten antybiotyk pod wpływem czynników stresowych związanych z HPP. W przypadku pozostałych antybiotyków obserwowano zróżnicowaną odpowiedź, jednak ogólny trend wskazywał na nasilenie oporności wraz ze wzrostem intensywności zastosowanego ciśnienia.

Istotnym aspektem uzyskanych wyników jest fakt, że obserwowane zmiany ilościowe przekładały się na jakościowe zmiany fenotypu oporności. Szczególnie wyraźne było to w przypadku tetracykliny, gdzie wszystkie szczepy pierwotnie wrażliwe zostały sklasyfikowane jako oporne po zastosowaniu HPP. Podobny kierunek zmian, choć o mniejszym

nasileniu, dotyczył linkomycyny oraz fosfomycyny, gdzie znaczna część szczepów nabywała fenotyp oporności. W przypadku trimetoprimu/sulfametoksazolu zmiany fenotypowe występowały rzadziej, jednak również wskazywały na możliwość indukowania oporności.

Dodatkowo, po przywróceniu optymalnych warunków wzrostu obserwowano dalsze nasilenie zmian w profilu wrażliwości w stosunku do wartości bezpośrednio po ekspozycji na HPP. Szczególnie widoczne było to dla linkomycyny oraz fosfomycyny, gdzie część izolatów wykazywała dalszy wzrost wartości MIC. Również w przypadku cyprofloksacyny i klindamycyny odnotowano pogłębienie zmian u części szczepów. Co istotne, podwyższone wartości MIC dla tetracykliny utrzymywały się po zakończeniu działania czynnika stresowego, co sugeruje stabilizację indukowanych zmian i potencjalnie trwały charakter nabytej oporności.

6.4.3. Wpływ na zmiany w zdolności wytwarzania śluzu i tworzenia biofilmu

Po zastosowaniu zabiegów HPP zaobserwowano wzrost zdolności do tworzenia biofilmu u wszystkich analizowanych szczepów. Efekt ten wystąpił niezależnie od zastosowanego poziomu ciśnienia i początkowej zdolności izolatów do tworzenia biofilmu. Zwiększona produkcja biofilmu utrzymywała się po przywróceniu optymalnych warunków środowiskowych (po ekspozycji na 200 MPa) (**Tabela 3 – P2**)

Jeśli chodzi o produkcję śluzu, fenotyp ten wykryto u trzech szczepów (50,0%) dopiero po ekspozycji na ciśnienie 200 MPa. Izolaty te nie wykazywały zdolności do produkcji śluzu przed stresem. Obserwowane zmiany w produkcji śluzu były przejściowe i nie utrzymywały się po przywróceniu optymalnych warunków wzrostu (**Tabela 3 – P2**).

6.4.4. Wpływ na zmiany ekspresji genów oporności i wirulencji

W niniejszym badaniu przeanalizowano względną ekspresję genów związanych z wirulencją należących do LIPI-1 oraz wybranych genów oporności na antybiotyki u szczepów *L. monocytogenes* poddanych ciśnieniu 200 MPa i 400 MPa, a także po przywróceniu optymalnych warunków wzrostu (po ciśnieniu 200 MPa). Ogólnie rzecz biorąc, większość genów wykazywała jedynie niewielkie zmiany w ekspresji w porównaniu z warunkami kontrolnymi. W przypadku genów LIPI-1 względne poziomy ekspresji wynosiły od 0,62 do 1,75 po obróbce ciśnieniem 200 MPa, od 0,61 do 1,86 po przywróceniu warunków po obróbce ciśnieniem 200 MPa oraz od 0,88 do 1,96 po obróbce ciśnieniem 400 MPa, co wskazuje na ogólnie umiarkowaną modulację transkrypcji (**Rycina 2 – P2**).

W przypadku genów wirulencji LIPI-1 obserwowano przede wszystkim niewielkie odchylenia poziomu ekspresji względem warunków kontrolnych. Istotnym wyjątkiem był gen *actA*, dla którego odnotowano wyraźne obniżenie ekspresji u części analizowanych szczepów, utrzymujące się niezależnie od wariantu eksperymentalnego. Może to wskazywać na szczególną wrażliwość mechanizmów związanych z ruchem wewnątrzkomórkowym bakterii na działanie wysokiego ciśnienia. Z kolei wyraźną nadekspresję obserwowano głównie w przypadku genów *hly* oraz *osfX*, jednak zmiany te miały charakter szczepozależny i występowały tylko u wybranych izolatów oraz warunków eksperymentalnych.

Analiza ekspresji genów związanych z opornością na antybiotyki wykazała podobny schemat odpowiedzi komórkowej. Większość genów charakteryzowała się poziomami ekspresji zbliżonymi do obserwowanych w warunkach kontrolnych, co sugeruje, że HPP nie indukuje powszechnej aktywacji mechanizmów oporności na poziomie transkrypcyjnym. Niemniej jednak, szczególną uwagę zwraca wyraźna nadekspresja genów związanych z opornością na tetracyklinę, w tym *tetA_1*, *tetA_3* oraz *tetC*. Zmiany te były widoczne zarówno bezpośrednio po ekspozycji na ciśnienie, jak i po regeneracji komórek, co może wskazywać na trwałe przestawienie mechanizmów regulacyjnych u wybranych szczepów. Jednocześnie w niektórych przypadkach obserwowano również obniżenie ekspresji *tetC*, co podkreśla złożoność odpowiedzi i jej zależność od cech konkretnego szczepu.

Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że odpowiedź transkrypcyjna *L. monocytogenes* na działanie wysokiego ciśnienia ma charakter silnie szczepozależny. Szczególnie wyraźnym przykładem jest szczep Lm_5, który po ekspozycji na 200 MPa wykazywał szeroką nadekspresję zarówno genów wirulencji (sześć z siedmiu analizowanych: *prfA, hly, plcA, plcB, mpl, osfX*), jak i genów oporności na antybiotyki (pięciu z ośmiu analizowanych: *fosX, mprF, tetC, tetA_1, tetA_3*). Co istotne, podwyższony poziom ekspresji części z tych genów utrzymywał się również po przywróceniu optymalnych warunków wzrostu, co może sugerować trwałą adaptację do warunków stresowych. Odmienny profil odpowiedzi wykazywał natomiast szczep Lm_4, u którego po regeneracji po działaniu wyższego ciśnienia obserwowano wyraźne obniżenie ekspresji większości analizowanych genów, obejmujące wszystkie geny LIPI-1, jak i pięć z analizowanych genów związanych z opornością na antybiotyki (*osfX, lin, fosX, mprF, sulI, tetC*).

6.5. Analiza transferu genów oporności na antybiotyki

6.5.1. Charakterystyka szczepów donorowych

Na początku badań dotyczących transferu genów oporności wszystkie szczepy *L. monocytogenes* wykorzystane jako dawcy zostały przebadane pod kątem lokalizacji genów oporności na antybiotyki na plazmidach. Geny kodujące oporność na określony antybiotyk i zlokalizowane w plazmidach zostały przebadane pod kątem możliwości transferu. Szczegółową charakterystykę sześciu szczepów wybranych do dalszych badań przedstawiono w tabeli poniżej (Tabela 3) (**Tabela 1 – P3**).

Tabela 3. Wyjściowe profile antybiotykooporności i plazmidowa lokalizacja genów oporności u szczepów donorowych *L. monocytogenes.*

Szczep	Serotyp	Źródło izolacji	TET	LIN	CIP	FOS	DA	Obecne plazmidowe geny oporności
Lm_1	1/2c	Odpływ podłogowy	S	R	S	R	I	*tetA_1, tetA_3, tetC, lin, Lde, fosX, lnuA*
Lm_2		Odpływ podłogowy	S	R	S	R	S	*tetA_1, tetA_3, tetC, lin, Lde, fosX, mefA*
Lm_3		Linia produkcyjna	S	S	S	S	I	*tetA_1, tetA_3, tetC, lin, Lde, fosX*
Lm_4	1/2a	Sok	S	I	S	S	S	*tetA_1, tetA_3, tetC, lin, Lde, fosX*
Lm_5		Odpływ podłogowy	S	S	S	S	I	*tetA_1, tetA_3, tetC, lin, Lde, fosX*
Lm_6		Mrożone warzywa	S	S	S	S	S	*tetA_1, tetA_3, tetC, lin, Lde, fosX, lnuA, mefA*

S - wrażliwy, I – wrażliwy przy zwiększonej ekspozycji, R - oporny; TET - tetracyklina, LIN - linkomycyna, CIP - cyprofloksacyna, FOS - fosfomycyna, DA - klindamycyna.

6.5.2. Wpływ HPP na transfer genów oporności

6.5.2.1. Częstotliwość transferu genów

W eksperymentach in vitro oraz in situ jako dawcy wykorzystano sześć szczepów *L. monocytogenes*, a jako biorcę *E. faecalis* JH2-2. Wyniki wskazują, że działanie HPP wpłynęło na zmianę częstotliwości transferu genów oporności na antybiotyki w sposób zależny od ciśnienia i środowiska. Efekty były ogólnie silniejsze i bardziej zmienne w matrycy żywnościowej (sok z marchwi) niż w podłożu (**Tabela 4 – P3, Tabela S1 – P3**).

Ekspozycja szczepów *L. monocytogenes* na wysokie ciśnienie o wartości 400 MPa w warunkach in situ prowadziła do wyraźnego zwiększenia częstotliwości horyzontalnego transferu genów oporności, szczególnie tych związanych z opornością na tetracyklinę oraz fosfomycynę. Zjawisko to było najbardziej widoczne w matrycy żywnościowej, gdzie

obserwowano intensyfikację transferu genów *tetA_1*, *tetA_3*, *tetC* oraz *fosX*. Wzrost ten wskazuje, że stres środowiskowy wywołany wysokim ciśnieniem może sprzyjać rozprzestrzenianiu determinant oporności między komórkami bakteryjnymi. W warunkach in vitro obserwowano podobny kierunek zmian, jednak były one zazwyczaj mniej nasilone, co podkreśla znaczenie środowiska żywnościowego jako czynnika modulującego efektywność transferu genów.

W przypadku oporności na cyprofloksacynę uzyskane wyniki miały charakter niejednoznaczny i silnie zależały od badanego szczepu. U części transkoniugantów zaobserwowano wzrost częstotliwości transferu po zastosowaniu 400 MPa w warunkach in situ, podczas gdy w innych przypadkach odnotowano spadek lub jedynie niewielkie zmiany, szczególnie w środowisku hodowlanym. Co istotne, we wszystkich analizowanych wariantach eksperymentalnych nie wykryto transferu genu *Lde*, co sugeruje, że obserwowane zmiany fenotypowe związane z opornością na cyprofloksacynę nie były bezpośrednio powiązane z tym konkretnym mechanizmem genetycznym.

Dodatkowo, dla niektórych kombinacji szczep–antybiotyk odnotowano obniżenie częstotliwości transferu genów oporności po zastosowaniu HPP. Dotyczyło to między innymi wybranych transkoniugantów w przypadku tetracykliny, fosfomycyny oraz klindamycyny. Wyniki te wskazują na złożony i nieliniowy charakter odpowiedzi bakterii na stres wysokociśnieniowy, który może zarówno stymulować, jak i ograniczać procesy transferu genów, w zależności od właściwości konkretnego izolatu oraz warunków środowiskowych.

Analiza statystyczna potwierdziła istotność części obserwowanych zależności. Wykazano istotny wpływ warunków eksperymentalnych na częstotliwość transferu w przypadku cyprofloksacyny w środowisku in situ, a także dla wybranych antybiotyków przy określonych poziomach ciśnienia. Różnice pomiędzy antybiotykami po zastosowaniu 400 MPa w matrycy żywnościowej były również statystycznie istotne, co wskazuje na zróżnicowaną podatność poszczególnych mechanizmów oporności na działanie wysokiego ciśnienia. Dodatkowo analiza korelacji ujawniła silne zależności dla wybranych układów, co potwierdza, że odpowiedź bakterii na HPP ma charakter wieloczynnikowy i zależy od interakcji pomiędzy szczepem, antybiotykiem oraz środowiskiem (**Tabela S8–S12 – P3**).

6.5.2.2. Potwierdzenie transferu i lokalizacja genów u transkoniugantów

Analiza molekularna potwierdziła transfer badanych genów do szczepu biorcy. U uzyskanych transkoniugantów stwierdzono obecność genów oporności na tetracykliny

(*tetA_1*, *tetA_3*, *tetC*) oraz fosfomycyny (*fosX*). Lokalizacja tych genów była zróżnicowana w zależności od warunków eksperymentu. Gen *fosX* był wykrywany na plazmidach, natomiast po regeneracji po stresie 400 MPa w warunkach *in vitro* był obecny zarówno w genomie, jak i na plazmidach. W przypadku genów tetracyklin, po regeneracji w warunkach 400 MPa *in situ* zaobserwowano transfer genomowy u większości transkoniugantów, z wyjątkiem TC-Lm_1, gdzie geny wykryto w obu frakcjach DNA (**Tabela 5 – P3**).

6.5.2.3. Charakterystyka uzyskanych transkoniugantów

6.5.2.3.1. Zmiany wartości minimalnych stężeń hamujących (MIC)

Transfer genów oporności skutkował zmianą fenotypu oporności, co potwierdzono poprzez oznaczanie wartości MIC. U zdecydowanej większości transkoniugantów zaobserwowano wzrost wartości MIC dla odpowiednich antybiotyków w porównaniu do szczepów donorowych. Wzrost ten był często wielokrotny, co świadczy o efektywnej ekspresji nabytych genów. Warto zauważyć, że dla cyprofloksacyny, pomimo braku transferu genu *Lde*, u wszystkich transkoniugantów odnotowano wzrost wartości MIC, co może wskazywać na indukcję innych, nieswoistych mechanizmów oporności u biorcy (Tabela 4) (**Tabela 6 – P3**).

Tabela 4. Zmiany wartości MIC u transkoniugantów w porównaniu do szczepów donorowych.

Antybiotyk	Kontrola (in vitro)	200 MPa (in vitro)	400 MPa (in vitro)	Kontrola (in situ)	200 MPa (in situ)	400 MPa (in situ)
Tetracyklina	↑	↑	↑	↑	↑/-	↑
Linkomycyna	↑	↑/↓	↑	↑	↑/↓	↑
Cyprofloksacyna	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Fosfomycyna	↑/-	↑	↑	↓	↑/-	↑
Klindamycyna	↑/↓/-	↑/↓	↑/↓	↑/↓/-	↑/-	↑/↓/-

Strzałki (↑, ↓, -) wskazują odpowiednio na wzrost, spadek lub brak zmiany wartości MIC u transkoniugantów w stosunku do szczepu donorowego.

6.5.2.3.2. Analiza genotypowa transkoniugantów

Dendrogram uzyskany w analizie UPGMA profili ERIC-PCR wyraźnie różnicuje populacje transkoniugantów. Grupa kontrolna i grupa poddana ciśnieniu 200 MPa wykazują wysokie podobieństwo genetyczne, tworząc wspólny klaster. W przeciwieństwie do nich, transkoniuganty uzyskane po stresie 400 MPa formują odrębny, odległy klaster, co dowodzi, że silny stres ciśnieniowy oraz regeneracja komórek indukują znaczące i spójne zmiany w genomie. Wyniki te wskazują, że stres ciśnieniowy może być czynnikiem selekcyjnym, prowadzącym do zmian w genotypie bakterii (**Rycina 1 – P3**).

7. Dyskusja

Listeria monocytogenes pozostaje jednym z najpoważniejszych zagrożeń mikrobiologicznych w łańcuchu żywnościowym, będąc głównym czynnikiem etiologicznym listeriozy – choroby charakteryzującej się wysokim współczynnikiem śmiertelności (Feng i in., 2020). Znaczenie tego patogenu wynika nie tylko z jego wirulencji, lecz także z wysokiego potencjału adaptacyjnego do warunków środowiskowych typowych dla przemysłu spożywczego oraz rosnącej oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe.

W kontekście rosnących oczekiwań konsumentów wobec żywności minimalnie przetworzonej, o krótkim składzie i pozbawionej syntetycznych konserwantów (*ang*. clean label), obserwuje się intensyfikację badań nad alternatywnymi, nietermicznymi metodami utrwalania żywności, w tym nad technologią wysokich ciśnień (Inguglia i in., 2023).

Dotychczasowe badania koncentrowały się głównie na ocenie bezpośredniej przeżywalności mikroorganizmów po zastosowaniu HPP. Wciąż jednak brakuje kompleksowych analiz dotyczących wpływu tej technologii na zmiany w obrębie wirulencji, antybiotykooporności oraz zdolności do horyzontalnego transferu genów oporności, a także na stabilność tych zmian po ustąpieniu czynnika stresowego. Badania prowadzone w ramach niniejszej rozprawy wypełniają luki w tej wiedzy (**P1**).

Z punktu widzenia bezpieczeństwa żywności kluczowe staje się nie tylko określenie redukcji liczby komórek, lecz również monitorowanie linii ewolucyjnych patogenu oraz jego potencjału adaptacyjnego. Badania epidemiologiczne wykazują wyraźną dominację linii filogenetycznej I (Lineage I), obejmującej serotypy 1/2a, 1/2c, 3a i 3c. Izolaty te charakteryzują się wysokim potencjałem adaptacyjnym do zróżnicowanych środowisk żywnościowych, co bezpośrednio koreluje z ich częstym udziałem w ogniskach listeriozy u ludzi (Shimojima i in., 2016; Korsak i in., 2012; O'Connor i in., 2010; Chen i in., 2015; Swetha i in., 2021; Capita i in., 2019). Analiza występowania genotypów wskazuje na specyficzną selekcję środowiskową: w próbkach żywności dominuje serotyp 1/2a (66,7%), natomiast w środowisku przetwórczym najczęściej identyfikowany jest serotyp 1/2c (53,8%) (**P1**). Przeżywalność tych izolatów w zakładach produkcyjnych sugeruje, że mechanizmy oporności na stres są ściśle powiązane z ich strukturą genetyczną, co wymusza szczegółową analizę molekularną determinantów wirulencji stanowiących podstawę procesu infekcyjnego i warunkujących zdolność patogenu do pokonywania barier fizjologicznych gospodarza. Ich analiza jest niezbędna dla obiektywnej oceny zagrożenia stwarzanego przez izolaty przetrwałe w procesach technologicznych przetwarzania żywności (Kayode i in., 2022).

Głównym elementem patogenności *L. monocytogenes* jest wyspa patogenności LIPI-1, zawierająca zestaw genów: *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* oraz *plcB*. Szczególne znaczenie w diagnostyce wirulencji przypisuje się genowi *hly*, kodującemu listeriolizynę O (LLO), która umożliwia ucieczkę bakterii z fagosomu, oraz aktywatorowi transkrypcyjnemu PrfA, regulującemu ekspresję ponad 140 genów efektorowych (Hadjilouka i in., 2018; Paramithiotis i in., 2014). Obecność genów *hly* i *prfA* potwierdzono w niniejszych badaniach u wszystkich badanych izolatów, co jest zgodne z danymi literaturowymi wskazującymi na ich powszechność w populacji tego patogenu (Sudagidan i in., 2021; Iwu i in., 2020; Du i in., 2017).

Współczesna technologia żywności postrzega przetwarzanie wysokimi ciśnieniami jako strategiczną metodę nietermiczną, pozwalającą na skuteczną inaktywację patogenów przy jednoczesnej minimalizacji strat jakościowych produktu (Ferreira i in., 2016). W ujęciu molekularnym działanie ekstremalnych czynników fizycznych może prowadzić do indukcji złożonych szlaków odpowiedzi stresowej, co w konsekwencji zwiększa przeżywalność i potencjał adaptacyjny *L. monocytogenes*, zamiast prowadzić do jej całkowitej inaktywacji (**P2**).

Kluczową rolę w odpowiedzi na stres wysokociśnieniowy odgrywa alternatywny czynnik sigma kontrolujący regulon obejmujący ponad 300 genów odpowiedzialnych za adaptację do stresu i regulację wirulencji (Lungu i in., 2009; Wiktorczyk-Kapischke i in., 2022). Aktywacja systemów naprawczych umożliwia komórkom przetrwanie warunków subletalnych. Choć ciśnienie 200 MPa okazuje się niemal całkowicie nieefektywne w redukcji populacji, zastosowanie 400 MPa często obniża liczbę *L. monocytogenes* poniżej granicy wykrywalności (<10 CFU/mL) w warunkach in vitro, co wskazuje na osiągnięcie skutecznego poziomu inaktywacji (**P2**). Skuteczność inaktywacji HPP jest dodatkowo silnie modyfikowana przez właściwości macierzy żywnościowej. Składniki soku marchwiowego wykazują działanie ochronne, co potwierdza większa przeżywalność izolatów w badaniach in situ w porównaniu z badaniami in vitro (Simões Da Silva i in., 2020; Sionek i in., 2024). Stres wysokociśnieniowy może indukować przejściowy stan fizjologiczny, w którym komórki pozostają metabolicznie aktywne, lecz nie tworzą kolonii na standardowych podłożach (Godziszewska i in., 2016). Badania nad regeneracją populacji wykazały, że komórki subletalnie uszkodzone po ekspozycji na 400 MPa odzyskują aktywność metaboliczną i zdolność do wzrostu po przywróceniu optymalnych warunków (np. w temperaturze 30 °C), przy czym proces ten może zachodzić po 72 godzinach (**P2**), a nawet po 42 dniach, również w warunkach chłodniczych (Wideman i in., 2021; Valdramidis i in., 2015; Tomasula i in., 2014; Jofré i in., 2010). Oznacza to, że w momencie uzyskania wyniku negatywnego w standardowych testach mikrobiologicznych

w matrycy produktu mogą znajdować się komórki przechodzące rekonfigurację fenotypową. Mechanizm ten, wspierany przez ochronne właściwości składników żywności, stanowi istotne wyzwanie dla systemów kontroli jakości, ponieważ patogen może odzyskać pełną zdolność wzrostu i ekspresji czynników wirulencji już po etapie oceny bezpieczeństwa, co potencjalnie wiąże się również ze zmianą profilu oporności na antybiotyki.

Technologia wysokich ciśnień istotnie wpływa na zmiany profilu ekspresji determinantów wirulencji. Ekspozycja na ciśnienie 200 MPa i 400 MPa indukuje nadekspresję genów *hly* oraz *osfX* (czynnika osłabiającego odpowiedź oksydacyjną makrofagów), co może paradoksalnie zwiększać wirulencję komórek, które przetrwały zabieg (Hamon i in., 2012; Prokop i in., 2017). Odpowiedź ta nie jest liniowa oraz ma charakter szczepozależny. Przykładowo dla genu *actA*, odpowiedzialnego za polimeryzację aktyny i rozprzestrzenianie się bakterii w tkankach, często obserwuje się obniżoną ekspresję, co sugeruje czasową niezdolność do transferu komórka-komórka (Pérez-Baltar i in., 2020; Quereda i in., 2021).

Kolejnym aspektem adaptacji jest tworzenie biofilmu, kontrolowane przez geny *inlB*, *luxS* oraz alternatywny czynnik sigma *sigB* (Hsu i in., 2020; Janez i in., 2021; Melian i in., 2022). Izolaty pochodzące ze środowiska produkcyjnego wykazują zdolność do tworzenia silniejszych biofilmów niż izolaty z żywności, co wynika z ich wcześniejszego kontaktu z subletalnymi czynnikami stresogennymi, takimi jak stres wywołany zmianami pH, czy ciśnieniem hydrostatycznym (Iwu & Okoh, 2020; Pereira i in., 2018). Stres wywołany HPP może trwale zwiększać zdolność przylegania i tworzenia biofilmu, co stanowi krytyczne wyzwanie dla jakości mikrobiologicznej prowadzonych procesów w praktyce przemysłowej (Ritz i in., 2001; Bonsaglia i in., 2014). Fakt, że przeżycie procesów utrwalania promuje szczepy o podwyższonej wirulencji i zdolnościach adhezyjnych, prowadzić może bezpośrednio do zwiększonego problemu oporności bakterii na antybiotyki.

Monitorowanie oporności na antybiotyki u *L. monocytogenes* jest niezbędne ze względu na rosnącą presję selekcyjną w łańcuchu żywnościowym (Iwu & Okoh, 2020; Swetha i in., 2021). Choć patogen ten jest zazwyczaj wrażliwy na leki pierwszego rzutu, niepokój budzi wysoka oporność na klindamycynę (30,0% izolatów), występująca w specyficznym fenotypie LR/MS (oporność na lincozamidy przy jednoczesnej wrażliwości na makrolidy, np. erytromycynę) (Escolar i in., 2017; Zhou i in., 2019). Genetyczne podłoże tej oporności wiąże się z obecnością genów *lnuA* i *mefA*, jednak brak tych determinantów u niektórych opornych fenotypowo szczepów sugeruje udział enzymów modyfikujących strukturę antybiotyku, indukowanych przez stres środowiskowy (Escolar i in., 2017; Sanlıbaba i in., 2018). Technologia HPP dodatkowo wpływa na wzrost wartości MIC dla linkomycyny, fosfomycyny

oraz tetracykliny (**P2**). Wzrost oporności na tetracyklinę jest ściśle powiązany z nadekspresją genów *tetA_1*, *tetA_3* i *tetC* indukowaną przez wysokie ciśnienie (**P2**). Odnotowano również oporność na trimetoprim/sulfametoksazol (12,5%), skorelowaną z obecnością genów *sulI* (u 80% opornych szczepów) (**P2**) oraz *sulII* (Srinivasan i in., 2005). Zjawiska te dowodzą konieczności rygorystycznej kontroli zmian antybiotykooporności pod wpływem procesów HPP, aby zapobiec selekcji szczepów o obniżonej podatności na antybiotyki.

Analiza fenotypowa szczepów po regeneracji ujawnia alarmujący wzrost wartości MIC dla kluczowych antybiotyków. Szczepy pierwotnie wrażliwe na linkomycynę, fosfomycynę czy tetracyklinę po stresie ciśnieniowym nabywają cechy wysokiej oporności, co w przypadku tetracykliny objawia się wzrostem wartości MIC do poziomu 1–4 μg/mL (osiągając dla szczepów Lm_4, Lm_5 i Lm_6 wartość 4 μg/mL), a dla linkomycyny do poziomów od 4 do nawet 64 μg/mL (**P2**). Zmiany te nie mają charakteru przejściowego, a indukowana oporność utrzymuje się nawet po przywróceniu optymalnych warunków środowiskowych. Mechanizmy molekularne odpowiedzialne za ten proces obejmują nadekspresję genów *tetA_1*, *tetA_3* oraz *tetC*, które często pozostają uśpione lub wykazują niską ekspresję w warunkach fizjologicznych (**P2**, Duru i in., 2021). Równolegle ze zmianą oporności następuje rekonfiguracja potencjału wirulencji, przejawiająca się nadekspresją genów *hly* (listeriolizyna O) i *osfX* przy jednoczesnej redukcji ekspresji genu *actA*. Obserwowana modulacja wskazuje na zmianę strategii patogenu indukowaną stresem ciśnieniowym, polegającą na ograniczeniu inwazyjności (*actA*) oraz nasileniu mechanizmów adhezji i przetrwania, w tym tworzenia biofilmu.

Kolejnym krytycznym aspektem jest rola HPP jako czynnika stresowego wpływającego na horyzontalny transfer genów, który stanowi kluczowy mechanizm rozprzestrzeniania się oporności w środowisku żywnościowym (Godziszewska i in., 2016; Jahan i in., 2016). Ciśnienie 400 MPa indukuje zwiększoną przepuszczalność błon komórkowych, co w sposób fizyczny ułatwia wymianę materiału genetycznego pomiędzy mikroorganizmami w środowisku żywnościowym (Sehrawat i in., 2021). Niniejsze badania nad transferem genów oporności (m.in. *fosX* oraz genów *tet*) z *L. monocytogenes* do biorcy *E. faecalis* JH2-2 wykazały, że HPP może istotnie modyfikować częstotliwość tego procesu (**P3**). Co istotne, efekt ten ma charakter wybiórczy – intensyfikacji ulega transfer determinantów oporności na fosfomycynę i tetracyklinę, podczas gdy niektóre z nich nie są przekazywany, co wskazuje na specyficzne ograniczenia koniugacji pod wpływem stresu wysokociśnieniowego (**P3**).

Częstotliwość HGT zależy jednak od środowiska fizykochemicznego i właściwości macierzy żywnościowej. W warunkach laboratoryjnych (in vitro) zastosowanie 400 MPa generalnie redukowało częstość transferu, natomiast w modelu in situ w soku marchwiowym

odpowiedź była znacznie bardziej złożona, co potwierdza ochronną rolę matrycy (**P3**). Składniki soku działają jak fizykochemiczna bariera, ograniczając siłę stresu mechanicznego, dzięki czemu szczepy takie jak Lm_4, Lm_5 i Lm_6 pozostają wykrywalne metodą płytkową po ekspozycji na 400 MPa, podczas gdy w podłożu ulegały całkowitej inaktywacji (**P2, P3**). Jednocześnie matryca modyfikuje dynamikę koniugacji. Transfer genu *tetC* obserwuje się z mniejszą częstością w soku niż w warunkach laboratoryjnych, co dowodzi, że interakcje z macierzą mogą zarówno sprzyjać przeżyciu komórek, jak i ograniczać rozprzestrzenianie wybranych determinantów oporności (Nawaz i in., 2011;Li i in., 2023). Zjawiska te wskazują, że skuteczność HPP oraz dynamika HGT są ściśle zależne od kontekstu środowiskowego. W konsekwencji przemysł spożywczy powinien odchodzić od uniwersalnych modeli walidacyjnych na rzecz optymalizacji parametrów procesu, uwzględniającej realne ryzyko regeneracji komórek oraz ewolucyjnych zmian w populacjach patogenów.

Analiza statystyczna ERIC-PCR i wygenerowany dendrogram potwierdzają głębokie zmiany genetyczne wywołane przez HPP. Izolaty poddane ciśnieniu 400 MPa tworzą najbardziej odrębny klaster, co świadczy o drastycznych przegrupowaniach genomowych i mutacjach adaptacyjnych (**P3**). Szczególnym ryzykiem jest transfer cichych genów oporności, które mogą być przekazywane przez szczepy o początkowej wrażliwości fenotypowej, co czyni żywność rezerwuarem ukrytych determinantów oporności (Duru i in., 2021; Sehrawat i in., 2021; Wiśniewski i in., 2024).

Analiza uzyskanych wyników dowodzi, że technologia HPP, mimo swojej skuteczności w redukcji liczby *L. monocytogenes*, może nieświadomie promować selekcję szczepów o zwiększonej wirulencji i oporności na antybiotyki. Zdolność *L. monocytogenes* do regeneracji w połączeniu z fizycznym ułatwieniem transferu genów przez uszkodzone błony, stanowi realne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Oznacza to, że obecny model oceny bezpieczeństwa żywności, oparty wyłącznie na liczbie przeżywających komórek bezpośrednio po procesie, jest niewystarczający. Przyszłe regulacje muszą uwzględniać monitorowanie zmian transkrypcyjnych i zmiany fenotypów opornych, aby zapobiec rozprzestrzenianiu się szczepów *L. monocytogenes*, które mogą okazać się niezwykle trudne do zwalczenia.

8. Wnioski i stwierdzenia końcowe

Na podstawie przeprowadzonych badań empirycznych oraz ich interpretacji sformułowano następujące, kluczowe wnioski i stwierdzenia końcowe:

1. Technologia wysokich ciśnień wpływa na *L. monocytogenes* w sposób zależny od parametrów procesu i matrycy żywnościowej, determinując zarówno skuteczność inaktywacji, jak i przeżywalność komórek (**H1**).
2. Technologia wysokich ciśnień pełni nie tylko funkcję metody inaktywacji mikroorganizmów, lecz także czynnika stresowego, który może indukować adaptacyjne odpowiedzi komórek *L. monocytogenes* (**H1**).
3. U badanych izolatów *L. monocytogenes* wykazano obecność genów antybiotykooporności warunkujących oporność na tetracyklinę (*tetC, tetA_1, tetA_3*), linkomycynę i klindamycynę (*lin, lnuA*), fosfomycynę (*fosX*) oraz trimetoprim/sulfametoksazol (*sulI, sulII, dfrA*), a także mechanizmów związanych z obniżoną wrażliwością na cyprofloksacynę (*Lde*) (**H2**).
4. U badanych izolatów stwierdzono obecność kluczowych genów wirulencji, w tym *actA, plcA, plcB, mpl* oraz *osfX*, związanych z wewnątrzkomórkowym rozprzestrzenianiem się, ucieczką z fagosomu i przeżywalnością bakterii, co potwierdza wysoki potencjał adaptacyjny badanych szczepów (**H2**).
5. Technologia wysokich ciśnień powodowała wzrost wartości MIC u *L. monocytogenes*, szczególnie dla tetracykliny, linkomycyny i fosfomycyny; zmiany te nasilały się przy wyższym ciśnieniu (400 MPa) i częściowo utrzymywały się po regeneracji komórek (**H3**).
6. Technologia wysokich ciśnień wpływa na fenotyp wirulencji, zwiększając zdolność tworzenia biofilmu u wszystkich badanych szczepów oraz indukując przejściową produkcję śluzu u części izolatów (**H3**).
7. Technologia wysokich ciśnień modulowała ekspresję genów związanych z opornością na antybiotyki i wirulencją (*tet, hly, actA*), a obserwowane zmiany współwystępowały ze zmianami fenotypowymi w zakresie antybiotykooporności i wirulencji, co potwierdza molekularne podłoże odpowiedzi adaptacyjnej *L. monocytogenes* na stres wysokociśnieniowy (**H3**).
8. Technologia wysokich ciśnień, szczególnie zastosowanie ciśnienia 400 MPa zwiększa, częstotliwość horyzontalnego transferu genów oporności na tetracykliny (*tetA_1*,

tetA_3, *tetC*) oraz fosfomycynę (*fosX*) od szczepów *L. monocytogenes* do szczepu biorcy (**H4**).

9. Horyzontalny transfer genów indukowany przez technologię wysokich ciśnień prowadzi do powstania funkcjonalnie opornych transkoniugantów, co potwierdzono poprzez zaobserwowany wzrost wartości minimalnych stężeń hamujących (MIC) dla odpowiednich antybiotyków (**H4**).
10. Zdolność do transferu genów oporności przez *L. monocytogenes* w środowisku żywnościowym pod wpływem technologii wysokich ciśnień wskazuje na konieczność uwzględnienia ryzyka rozprzestrzeniania się oporności w ocenie nietermicznych metod utrwalania żywności (**H4**).
11. Subletalne parametry technologii wysokich ciśnień indukowały przejściowe zmiany ekspresji genów związanych z opornością na antybiotyki i wirulencją, wskazując na aktywację mechanizmów adaptacyjnych odpowiedzi *L. monocytogenes* na stres wysokociśnieniowy (**H5**).
12. Część zmian indukowanych przez HPP utrzymywała się po regeneracji komórek, czego przejawem był utrzymujący się wzrost wartości MIC oraz zmiany wybranych cech wirulencji, co wskazuje, że odpowiedź adaptacyjna wywołana stresem wysokociśnieniowym może wpływać na właściwości fenotypowe szczepów również po przywróceniu optymalnych warunków wzrostu (**H5**).
13. Przeżywalność szczepów *L. monocytogenes* poddanych działaniu HPP jest silnie zależna od środowiska, a matryca żywnościowa (sok z marchwi) wykazuje działanie ochronne w porównaniu do warunków *in vitro*, co podkreśla konieczność walidacji procesów w warunkach zbliżonych do rzeczywistych (**H6**).
14. Efektywność technologii wysokich ciśnień jako metody inaktywacji *L. monocytogenes* zależy od parametrów procesu oraz właściwości środowiska, przy czym całkowita eliminacja nie zawsze jest osiągalna, co wskazuje na potrzebę szczegółowej walidacji procesu w odniesieniu do konkretnych warunków środowiskowych i szczepów (**H6**).

Wyniki przeprowadzonych badań dostarczają nowych, istotnych informacji na temat mechanizmów adaptacyjnych *L. monocytogenes* w odpowiedzi na działanie technologii wysokich ciśnień. Potwierdzono obecność genów oporności na antybiotyki oraz genów wirulencji u szczepów wyizolowanych z żywności i środowiska jej produkcji, a także ich zdolność do horyzontalnego transferu wybranych determinantów genetycznych oporności. Wykazano, że zastosowanie HPP wpływa zarówno na cechy fenotypowe, jak i molekularne

badanych szczepów, prowadząc m.in. do zmian w ekspresji genów oporności i wirulencji, przejściowych lub utrwalonych zmian cech fenotypowych oraz wzrostu częstości transferu genów. Efekty te były zmienne w zależności od parametrów obróbki, szczepu oraz środowiska, przy czym sok marchwiowy wykazywał istotny efekt ochronny wobec komórek. Uzyskane wyniki wypełniają istotną lukę w wiedzy, wskazując, że ocena skutków działania HPP wyłącznie na podstawie klasycznych metod hodowlanych, w tym analizy płytkowej wykonywanej bezpośrednio po procesie, może być niewystarczająca do pełnego uchwycenia odpowiedzi komórek *L. monocytogenes*. W konsekwencji zasadne jest uzupełnianie takich badań o podejście molekularne, umożliwiające dokładniejszą ocenę wpływu warunków panujących podczas HPP na ekspresję i stabilność cech oporności oraz wirulencji patogenów takich jak *L. monocytogenes*.

9. Spis tabel i rycin

9.1. Spis rycin

Rycina 1. Etapy realizacji badań z uwzględnieniem spójnego tematycznie cyklu publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej. 32
Rycina 2. Schemat procedury badania transferu genów oporności na antybiotyki (**P3**). 44

9.2. Spis tabel

Tabela 1. Wybrane czynniki wirulencji u *L. monocytogenes* i ich funkcje. 19
Tabela 2. Charakterystyka szczepów *L. monocytogenes* (n=6) wybranych do badań funkcjonalnych (**P2** – **Tabela 1**). 51
Tabela 3. Wyjściowe profile antybiotykooporności i plazmidowa lokalizacja genów oporności u szczepów donorowych *L. monocytogenes*. 56
Tabela 4. Zmiany wartości MIC u transkoniugantów w porównaniu do szczepów donorowych. 58

10. Literatura

Abebe, E., Gugsa, G., & Ahmed, M. (2020). Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens. *Journal of Tropical Medicine,* 4674235. https://doi.org/10.1155/2020/4674235

Abera, G. (2019). Review on high-pressure processing of foods. *Cogent Food & Agriculture*, *5*, 1568725. https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1568725

Aertsen, A., Van Houdt, R., Vanoirbeek, K., & Michiels, C.W. (2004). An SOS response induced by high pressure in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *186*, 6133–6141. https:// doi.org/10.1128/JB.186.18.6133-6141.2004.

Aganovic, K., Grauwet, T., Siemer, C., Toepfl, S., Heinz, V., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2016). Headspace fingerprinting and sensory evaluation to discriminate between traditional and alternative pasteurization of watermelon juice. *European Food Research and Technology*, *242*, 787–803. https://doi.org/10.1007/s00217-015-2586-8.

Aganovic, K., Hertel, C., Vogel, Rudi. F., Johne, R., Schlüter, O., Schwarzenbolz, U., Jäger, H., Holzhauser, T., Bergmair, J., Roth, A., Sevenich, R., Bandick, N., Kulling, S. E., Knorr, D., Engel, K., & Heinz, V. (2021). Aspects of high hydrostatic pressure food processing: Perspectives on technology and food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *20*(4), 3225–3266. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12763.

Baharoglu, Z., Bikard, D., & Mazel, D. (2010). Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through integron activation. *PLoS Genetics*, *6*, e1001165. https://doi.org/10.1371/journal. pgen.1001165.

Baptista, I., Rocha, S.M., Cunha, Â., Saraiva, J.A., & Almeida, A. (2016). Inactivation of *Staphylococcus aureus* by high pressure processing: An overview. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *36*, 128–149. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.06.008

Bhunia, A.K. (2018). *Listeria monocytogenes*. In Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis; Bhunia, A.K., Ed.; Food Science Text Series; Springer: New York, NY, USA, pp. 229–248.

Bintsis, T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS Microbiology, 3*(3), 529–563. https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.529

Bolumar, T., Orlien, V., Sikes, A., Aganovic, K., Bak, K.H., Guyon, C., Stübler, A., De Lamballerie, M., Hertel, C. & Brüggemann, D.A. (2021). High-pressure processing of

meat: Molecular impacts and industrial applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *20*, 332–368. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12670

Bonsaglia, E., Silva, N., Fernades Júnior, A., Araújo Júnior, J., Tsunemi, M., & Rall, V. 2014. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control*, *35*, 386–391. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.023

Bowman, J.P., Bittencourt, C.R., & Ross, T. (2008). Differential gene expression of *Listeria monocytogenes* during high hydrostatic pressure processing. *Microbiology*, *154*, 462–475. https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/010314-0.

Bozoglu, F., Alpas, H., & Kaletun., G. (2004). Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *40*, 243–247. https://doi.org/10.1016/s0928-8244(04)00002-1

Bucur, F.I., Borda, D., Nicolau, A.I., & Grigore-Gurgu, L. (2020). Assessment of *L. monocytogenes* cells' capacity to recover in cucumber juice after high pressure treatment. Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI: Food Technology 44, 45–57. https://doi.org/10.35219/foodtechnology.2020.1.03

Campus, M. (2010). High Pressure Processing of Meat, Meat Products and Seafood. *Food Engineering Reviews*, 2, 256–273. https://doi.org/10.1007/s12393-010-9028-y

Capita, R., Felices-Mercado, A., & García-Fernández, C. (2019). Characterization of *Listeria monocytogenes* Originating from the Spanish Meat-Processing Chain. *Foods*, *8*, 542. https://doi.org/10.3390/foods8110542

Cavalcanti, A.A.C., Limeira, C.H., de Siqueira, I.N., de Lima, A.C., de Medeiros, F.J.C., de Souza, J.G., Medeiros, N.G.D.A., Oliveira Filho, A.A.D., & Melo, M.A.D. (2022). The prevalence of *Listeria monocytogenes* in meat products in Brazil: A systematic literature review and meta-analysis. *Research in Veterinary Science*, *145*, 169–176. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.02.015

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Fresh Produce–Associated Listeriosis Outbreaks, Sources of Concern, Teachable Moments, and Insights. Sprouts and Investigation of Human Listeriosis Cases (Final Update). Dostępny online: https://archive.cdc.gov/#/details?url=https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bean-sprouts-11-14/index.html (dostęp: 4 lutego 2026 r.).

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Listeria Outbreaks. Dostępny online: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html (dostęp: 4 lutego 2026 r.).

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Listeria Outbreak Linked to Packaged Salads Produced by Fresh Express. Dostępny online: https://archive.cdc.gov/#/details?url=https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/packaged-salad-12-21-b/index.html (dostęp: 4 lutego 2026 r.).

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Raw Milk Produced by Miller's Organic Farm in Pennsylvania (Final Updonlinee). Dostępny online: https://archive.cdc.gov/#/details?url=https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/raw-milk-03-16/index.html (dostęp: 4 lutego 2026 r.).

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Frozen Vegetables (Final Update). Dostępny online: https://archive.cdc.gov/#/details?url=https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/frozen-vegetables-05-16/index.html (dostęp: 5 lutego 2026 r.).

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Soft Raw Milk Cheese Made by Vulto Creamery (Final Update). Dostępny online: https://archive.cdc.gov/#/details?url=https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/soft-cheese-03-17/index.html (dostęp: 5 lutego 2026 r.).

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of Listeria Infections Linked to Hard-Boiled Eggs. Dostępny online: https://archive.cdc.gov/#/details?url=https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/eggs-12-19/index.html (dostęp: 7 lutego 2026 r.).

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of Listeria Infections Linked to Enoki Mushrooms. Dostępny online: https://archive.cdc.gov/#/details?url=https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/enoki-mushrooms-03-20/index.html (dostęp: 7 lutego 2026 r.).

Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Listeria Outbreak Linked to Fully Cooked Chicken. Dostępny online: https://archive.cdc.gov/#/details?url=https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/precooked-chicken-07-21/index.html (dostęp: 7 lutego 2026 r.).

Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Listeria Outbreak Linked to Ice Cream. Dostępny online: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/monocytogenes-06-22/index.html (dostęp: 7 lutego 2026 r.).

Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Commercially Produced, Prepackaged Caramel Apples Made from Bidart Bros.

Apples (Final Update). Dostępny online: https://archive.cdc.gov/#/details?q=https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/caramel-apples-12-14/index.html&start=0&rows=10&url=https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/caramel-apples-12-14/index.html (dostęp: 7 lutego 2026 r.).

Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Blue Bell Creameries Products (Final Update). Dostępny online: https://archive.cdc.gov/#/details?url=https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/ice-cream-03-15/index.html (dostęp: 7 lutego 2026 r.).

Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Packaged Salads Produced at Springfield, Ohio Dole Processing Facility (Final Update). Dostępny online: https://archive.cdc.gov/www_cdc_gov/listeria/outbreaks/bagged-salads-01-16/advice-consumers.html (accessed on 29 August 2023).

Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of Listeria Infections Linked to Deli Meats. Dostępny online: https://archive.cdc.gov/#/details?url=https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/delimeat-10-20/index.html (dostęp: 7 lutego 2026 r.).

Chen, G.W., Chen, Y.A., Chang, H.Y., Huang, T.C., & Chen, T.Y. (2021). Combined impact of high-pressure processing and slightly acidic electrolysed water on *Listeria monocytogenes* proteomes. *Food Research International*, *147*, 110494. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110494

Chen, M., Cheng, J., Wu, Q., Zhang, J., Chen, Y., Xue, L., Lei, T., Zeng, H., Wu, S., Ye, Q., Bai, J., & Wang, J. (2018) Occurrence, antibiotic resistance, and population diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh aquatic products in China. *Frontiers in Microbiology, 9,* 2215. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02215

Chen, M., Cheng, J., Zhang, J., Chen, Y., Zeng, H., Xue, L., Lei, T., Pang, R., Wu, S., Wu, H., Zhang, S., Wei, X., Zhang, Y., Ding, Y., & Wu, Q. (2019). Isolation, Potential Virulence, and Population Diversity of *Listeria monocytogenes* From Meat and Meat Products in China. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 946. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00946

Chen, M., Wu, Q., Zhang, J., Wu, S., & Guo, W. (2015). Prevalence, Enumeration, and Pheno- and Genotypic Characteristics of *Listeria monocytogenes* Isolated from Raw Foods in

South China. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 1026. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01026

Chen, Y., Burall, L. S., Luo, Y., Timme, R., Melka, D., Muruvanda, T., Payne, J., Wang, C., Kastanis, G., Maounounen-Laasri, A., De Jesus, A. J., Curry, P. E., Stones, R., K'Aluoch, O., Liu, E., Salter, M., Hammack, T. S., Evans, P. S., Parish, M., Allard, M. W., Datta, A., Strain, E. A., & Brown, E. W. (2016). *Listeria monocytogenes* in stone fruits linked to a multistate outbreak: Enumeration of cells and whole-genome sequencing. *Applied and Environmental Microbiology, 82*(24), 7030–7040. https://doi.org/10.1128/AEM.01486-16

Cheng, R.M., Usaga, J., & Worobo, R.W. (2024). Foodborne pathogen inactivation in fruit juices utilizing commercial scale high-pressure processing: effects of acidulants and pH. Food Sci Technol. Int. 30, 592–600. https://doi.org/10.1177/10820132231219525

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2020). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (30th ed., CLSI supplement M100). CLSI.

Cotter, P.D., Draper, L.A., Lawton, E.M., Daly, K.M., Groeger, D.S., Casey, P.G., Ross, R.P., & Hill, C. (2008). Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of Lineage I *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathogens*, *4*, e1000144. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000144

Daher, D., Le Gourrierec, S., & Perez-Lamela, C. (2017). Effect of high pressure processing on the microbial inactivation in fruit preparations and other vegetable based beverages. *Agriculture*, *7*(9), 72. https://doi.org/10.3390/agriculture7090072

Das, A., Sai Mala, G., Singh, R.S., Majumdar, A., Chatterjee, R., Chaudhuri, I., & Mahapatra, T. (2019). Prelacteal feeding practice and maintenance of exclusive breast feeding in Bihar, India-Identifying key demographic sections for childhood nutrition interventions: A cross-sectional study. *Global Biosecurity*, *1*, 1. https://doi.org/10.12688/gatesopenres.12862.3

De Melo Tavares, R., da Silva, D.A.L., Camargo, A.C., Yamatogi, R.S., & Nero, L.A. (2020). Interference of the acid stress on the expression of *llsX* by *Listeria monocytogenes* pathogenic island 3 (LIPI-3) variants. *Food Research International*, *132*, 109063. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109063

Deekshit, V.K., & Srikumar, S. (2022) 'To be, or not to be'-The dilemma of 'silent' antimicrobial resistance genes in bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, *133*, 2902–2914. https://doi.org/10.1111/jam.15738

Disson, O., Moura, A., & Lecuit, M. (2021). Making sense of the biodiversity and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Trends in Microbiology*, *29*, 811–822. https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.01.008

Du, X.J., Zhang, X., Wang, X.Y., Su, Y.L., Li, P., & Wang, S. (2017). Isolation and Characterization of *Listeria monocytogenes* in Chinese Food Obtained from the Central Area of China. *Food Control*, *74*, 9–16. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.024

Duru, I. C., Andreevskaya, M., Laine, P., Paulin, L., Auvinen, P., & Björkroth, J. (2020). Genomic characterization of the most barotolerant *Listeria monocytogenes* RO15 strain compared to reference strain Scott A. *BMC Genomics, 21*, 542. https://doi.org/10.1186/s12864-020-06819-0

Duru, I.C., Bucur, F.I., Andreevskaya, M., Nikparvar, B., Ylinen, A., Grigore-Gurgu, L., Rode, T.M., Crauwels, P., Laine, P., Paulin, L., Løvdal, T., Riedel, C.U., Bar, N., Borda, D., Nicolau, A.I., & Auvinen, P. (2021). High-pressure processing-induced transcriptome response during recovery of *Listeria monocytogenes*. *BMC Genomics*, *22*, 117. https://doi.org/10.1186/s12864-021-07407-6.

Escolar, C., Gómez, D., Del Carmen Rota García, M., 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 Disease*, *14*(6), 357–363. https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2244

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2018a). Epidemiological Update: Multi-Country Outbreak of *Listeria monocytogenes* Serogroup IVb, Multi-Locus Sequence Type 6 Infections. Dostępny online: https://www.ecdc.europa.eu/en/newsevents/epidemiological-update-multi-country-outbreak-listeria-monocytogenes-serogroup-ivb (dostęp 08 lutego 2026 r.).

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2018b). Multicountry Outbreak of *Listeria monocytogenes* Infections Linked to Consumption of Salmon Products. Dostępny online: https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/multi-country-outbreaklisteria-monocytogenes-infections-linked-consumption-salmon (dostęp 08 lutego 2026 r.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2019). Multicountry Outbreak of *Listeria monocytogenes* Clonal Complex Infections Linked to Consumption of Cold-Smoked Fish Products. Dostępny online: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/20190423_Joint_ECDC-EFSA_ROA_UI-452_Lm-ST1247.pdf (dostęp 08 lutego 2026 r.)

European Food Safety Authority (EFSA), & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2024). The European Union One Health 2023 Zoonoses report. *EFSA Journal*, *22*. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.9106

European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control. (2025). The European Union One Health 2024 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, *23*(1), 9759. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2025.9759

Feng, Y., Yao, H., Chen, S., Sun, X., Yin, Y., & Jiao, X. (2020). Rapid Detection of Hypervirulent Serovar 4h *Listeria monocytogenes* by Multiplex PCR. *Frontiers in Microbiology* , 11, 1309. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01309

Ferreira, M., Almeida, A., Delgadillo, I., Saraiva, J., & Cunha, Â. (2016). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* to high pressure processing: A review. *Food Reviews International*, *32*, 377–399, https://doi.org/10.1080/87559129.2015.1094816

Godreuil, S., Galimand, M., Gerbaud, G., Jacquet, C., & Courvalin, P. (2003). Efflux pump *Lde* is associated with fluoroquinolone resistance in *Listeria monocytogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *47*, 704–708. https://doi.org/10.1128/AAC.47.2.704-708.2003

Godziszewska, J., Guzek, D., Głąbski, K., & Wierzbicka, A. (2016). Mobile antibiotic resistance – The spread of genes determining the resistance of bacteria through food products. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, *70*, 803–810. https://doi.org/10.5604/17322693.1209214

Gomes, B.A.F., Alexandre, A.C.S., De Andrade, G.A.V., Zanzini, A.P., De Barros, H.E.A., Ferraz E Silva, L.M.D.S., Costa, P.A., & Boas, E.V.D.B.V. (2023). Recent advances in processing and preservation of minimally processed fruits and vegetables: A review – Part 2: Physical methods and global market outlook. *Food Chemistry Advances*, *2*, 100304. https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100304

Gonzalez-Tejedor, G., Garre, A., Egea, J.A., Aznar, A., Artes-Hernandez, F., & Fernandez, P.S. (2023). Application of High Hydrostatic Pressure in fresh purple smoothie: Microbial inactivation kinetic modelling and qualitative studies. *Food Science and Technology International*, *29*, 372–382. https://doi.org/10.1177/10820132221095607

Gouvea, Fabiola S., Padilla-Zakour, O., I., Worobo, R.W., Xavier, B.M., Walter, E.H., & Rosenthal, A. (2020). Effect of high-pressure processing on bacterial inactivation in acai juices with varying pH and soluble solids content. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *66*, https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102490

Granier, S.A., Moubareck, C., Colaneri, C., Lemire, A., Roussel, S., Dao, T.T., & Brisabois, A. (2011). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*, 2788–2790. https://doi.org/10.1128/AEM.01381-10

Hadjilouka, A., Paramithiotis, S., & Drosinos, E.H. (2018). Genetic Analysis of the *Listeria* Pathogenicity Island 1 of *Listeria monocytogenes* 1/2a and 4b Isolates. *Currnt Microbiology* , 75, 857–865. https://doi.org/10.1007/s00284-018-1458-4

Hamon, M. A., Ribet, D., Stavru, F., & Cossart, P. (2012). Listeriolysin O: The Swiss army knife of *Listeria*. *Trends in Microbiology*, *20*(8), 360–368. https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.04.006

Hassan, A., Khan, M. K. I., Fordos, S., Hasan, A., Khalid, S., Naeem, M. Z., & Usman, A. (2024). Emerging Foodborne Pathogens: Challenges and Strategies for Ensuring Food Safety. *Biology and Life Sciences Forum*, *31*(1), 32. https://doi.org/10.3390/ECM2023-16596

Hsu, C., Cairns, L., Hobley, L., & Abbott, J. (2020). Genomic differences between *Listeria monocytogenes* EGDe isolates reveal crucial roles for SigB and wall rhamnosylation in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, *202*(1), e00692-19. https://doi.org/10.1128/JB.00692-19

Huang, H.W., Wu, S.Z., Lu, J.K., Shyu, Y.T., &Wang, C.Y. (2017). Current status and future trends of high-pressure processing in food industry. *Food Control*, 72, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.019

Hwang, C.C., Lin, C.S., Hsiao, Y.T., Huang, Y.L., Yen, F.L., Lee, Y.C., & Tsai, Y.H. (2023). Inactivation Kinetics of Foodborne Pathogens in Carrot Juice by High-Pressure Processing. *Biology*, *12*. https://doi.org/10.3390/biology12111383

Inguglia, E.S., Song, Z., Kerry, J.P., O'Sullivan, M.G., & Hamill, R.M. (2023). Addressing Clean Label Trends in Commercial Meat Processing: Strategies, Challenges and Insights from Consumer Perspectives. *Foods*, *12*(10):2062. https://doi.org/10.3390/foods12102062

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*,

ISO 20776-1:2019 – *Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices.* Part 1: *Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases*.

Iwu, C.D., & Okoh, A.I. (2020). Characterization of antibiogram fingerprints in *Listeria monocytogenes* recovered from irrigation water and agricultural soil samples. *PLoS ONE*, *15*(2), e0228956. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228956

Jahan, M., & Holley, R.A. (2016). Transfer of Antibiotic Resistance from *Enterococcus faecium* of Fermented Meat Origin to *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Letters in Applied Microbiology*, *62*, 304–310. https://doi.org/10.1111/lam.12553

Janez, N., Skrlj, B., Sternisa, M., Klancnik, A., & Sabotic, J. (2021). The role of the *Listeria monocytogenes* surfactome in biofilm formation. *Microbial Biotechnology*, *14*(4), 1269–1281. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13778

Jofré, A., Aymerich, T., Bover-Cid, S., & Garriga, M. (2010). Inactivation and recovery of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* after high hydrostatic pressure treatments up to 900 MPa. *International Microbiology*, *13*, 105–112. https://doi.org/10.2436/20.1501.01.115

Kayode, A.J., & Okoh, A.I. (2022). Incidence and genetic diversity of multi-drug resistant *Listeria monocytogenes* isolates recovered from fruits and vegetables in the Eastern Cape Province, South Africa. *International Journal of Food Microbiology*, *363*, 109513. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109513

Kayode, A.J., & Okoh, A.I. (2023). Antimicrobial-resistant *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: implications for food safety and risk assessment. *Foods*, *12*(6), 1346. https://doi.org/10.3390/foods12061346

Komisja Europejska. (2024). *Rozporządzenie Komisji (UE) 2024/2895 z dnia 20 listopada 2024 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 2073/2005 w odniesieniu do Listeria monocytogenes w żywności gotowej do spożycia*. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej.

Korsak, D., Borek, A., Daniluk, S., Grabowska, A., & Pappelbaum, K. (2012). Antimicrobial Susceptibilities of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Food and Food Processing Environment in Poland. *International Journal of Food Microbiology* , *158*, 203–208. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.016

Koutsoumanis, K., Alvarez- Ord´o˜nez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Herman, L., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Castle, L., Crotta, M., Grob, K., Milana, M.R., Petersen, A., Roig Sagu´es, A.X., Vinagre Silva, F., Barth´el´emy, E., Christodoulidou, A., Messens, W., & Allende, A. (EFSA Panel on Biological Hazards

(BIOHAZ Panel) (2022). The efficacy and safety of high- pressure processing of food. *EFSA Journal*, *20*. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7128

Kovacevic, J., Sagert, J., Wozniak, A., Gilmour, M.W., & Allen, K.J. (2013). Antimicrobial resistance and co-selection phenomenon in *Listeria* spp. recovered from food and food production environments. *Food Microbiology, 34,* 319–327. https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.01.002

Lee, P.Y., Leong, S.Y., & Oey, I. (2024). Prospects of pulsed electric fields technology in food preservation and processing applications from sensory and consumer perspectives. *International Journal of Food Science and Technology*, *59*, 6925–6943. https://doi.org/10.1111/ijfs.17515

Li, L., Olsen, R.H., Ye, L., Wang, W., Shi, L., Yan, H., & Meng, H. (2016). Characterization of antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from a pork processing plant and its respective meat markets in southern China. *Foodborne Pathogens and Disease*, *13*(5), 262–8. https://doi.org/10.1089/fpd.2015.2087

Li, L.G., & Zhang, T. (2023). Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance Gene Transfer under Environmental Stresses: Insights from Laboratory-Based Studies. *Science of the Total Environment*, *887*, 163870. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163870

Lim, S.Y., Yap, K.P., & Thong, K.L. (2016). Comparative genomics analyses revealed two virulent *Listeria monocytogenes* strains isolated from ready-to-eat food. *Gut Pathogens*, *8*, 65. https://doi.org/10.1186/s13099-016-0147-8

Lima-Noronha, M.A., Fonseca, D.L.H., Oliveira, R.S., Freitas, R.R., Park, J.H., & Galhardo, R.S., (2022). Sending out an SOS - the bacterial DNA damage response. *Genetics and Molecular Biology*, *45*, e20220107. https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2022-0107

Lopes-Luz, L., Mendona, M., Bernardes Fogaa, M., Kipnis, A., Bhunia, A.K., & Bührer-Sékula, S. (2021). *Listeria monocytogenes*: Review of pathogenesis and virulence determinants-targeted immunological assays. *Critical Review in Microbiology*, 47, 647–666. https://doi.org/10.1080/1040841x.2021.1911930

Lorenzo, J.M., Munekata, P.E., Dominguez, R., Pateiro, M., Saraiva, J.A., & Franco, D., (2018). Main Groups of Microorganisms of Relevance for Food Safety and Stability, in: Innovative Technologies for Food Preservation. *Elsevier*, pp. 53–107. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811031-7.00003-0

Lungu, B., Ricke, S.C., & Johnson, M.G. (2009). Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions. *Anaerobe*, 15, 7–17. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.08.001

Magalhães, R., Almeida, G., Ferreira, V., Santos, I., Silva, J., Mendes, M. M., Pita, J., Mariano, G., Mâncio, I., Sousa, M. M., Farber, J., Pagotto, F., Teixeira, P., & Ferreira, M. A. S. (2015). Cheese-related listeriosis outbreak, Portugal, March 2009 to February 2012. *Eurosurveillance, 20*(17), 21104. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.17.21104

Markwide Research Report (2025). Global Non-Thermal Pasteurization Market Size by Techniques (High Pressure Processing (HPP), Pulse Electric Field (PEF)), By Application (Food, Beverages), By Food Form (Solid Form, Liquid Form), By Geographic Scope And Forecast (No. 395700). https://www.marketresearch.com/Maia-Research-v4212/Global-Non-Thermal-Pasteurization-Trends-44533760/ (dostęp 12 lutego 2026 r.)

Maury, M.M., Tsai, Y.H., Charlier, C., Touchon, M., Chenal-Francisque, V., Leclercq, A., Criscuolo, A., Gautier, C., Roussel, S., & Brisabois, A. (2016). Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nature genetics*, *48*, 308–313. https://doi.org/10.1038/ng.3501

Melian, C., Bentancourt, E., Castellano, P., Ploper, D., Vignolo, G., & Mendoza, L. M. (2022). Biofilm genes expression of *Listeria monocytogenes* exposed to *Latilactobacillus curvatus* bacteriocins at 10 °C. *International Journal of Food Microbiology*, *370*, 109648. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109648

Nabi, B.G., Mukhtar, K., Arshad, R.N., Radicetti, E., Tedeschi, P., Shahbaz, M.U., Walayat, N., Nawaz, A., Inam-Ur-Raheem, M., & Aadil, R.M. (2021). High-Pressure Processing for Sustainable Food Supply. *Sustainability*, *13*, 13908. https://doi.org/10.3390/su132413908

Nakaura, Y., Morimatsu, K., Inaoka, T., & Yamamoto, K. (2019). *Listeria monocytogenes* cells injured by high hydrostatic pressure and their recovery in nutrient-rich or -free medium during cold storage. *High Pressure Research*, *39*(2), 324–333. https://doi.org/10.1080/08957959.2019.1584895

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*. https://doi.org/10.1155/2018/7389381

Nawaz, M., Wang, J., Zhou, A., Ma, C., Wu, X., Moore, J.E., Cherie Millar, B., & Xu, J. (2011). Characterization and Transfer of Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria from Fermented Food Products. *Current Microbiology*, *62*, 1081–1089. https://doi.org/10.1007/s00284-010-9856-2

Nesterova, E., Morozova, P., Gladkikh, M., Kazemzadeh, S., & Syromyatnikov, M. (2024). Molecular methods for detecting microorganisms in beverages. *Beverages*, *10*, 46. https://doi.org/10.3390/beverages10020046

Nho, S. W., Abdelhamed, H., Reddy, S., Karsi, A., & Lawrence, M. L. (2015). Identification of high-risk Listeria monocytogenes serotypes in lineage I (serotype 1/2a, 1/2c, 3a and 3c) using multiplex PCR. Journal of Applied Microbiology*, 119*(3), 845–852. https://doi.org/10.1111/jam.12876

Noll, M., Kleta, S., & Al Dahouk, S. (2018). Antibiotic susceptibility of 259 *Listeria monocytogenes* strains isolated from food, food-processing plants, and human samples in Germany. *Journal of Infection and Public Health*, *11*(4), 572-577. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.12.007

O'Connor, L., O'Leary, M., Leonard, N., Godinho, M., O'Reilly, C., Egan, J., & O'Mahony, R. (2010). The Characterization of *Listeria* spp. Isolated from Food Products and the Food-Processing Environment. *Letters in Applied Microbiology*, *51*, 490–498. https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2010.02928.x

Olaimat, A.N., Al-Holy, M.A., Shahbaz, H.M., Al-Nabulsi, A.A., Abu Ghoush, M.H., Osaili, T.M., Ayyash, M.M., & Holley, R.A. (2018). Emergence of Antibiotic Resistance in *Listeria monocytogenes* Isolated from Food Products: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *17*, 1277–1292. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12387

Ozaybi, N. (2024). High-Pressure Processing of Milk and Dairy Products: Latest Update. *Processes*, *12*, 2073. https://doi.org/10.3390/pr12102073

Paramithiotis, S., Hadjilouka, A., & Drosinos, E.H. (2014). Listeria Pathogenicity Island 1. Structure and Function. In *Listeria Monocytogenes*: Food Sources, Prevalence and Management Strategies; Hambrick, E.C., Ed.; Nova Publishers: New York, NY, USA, pp. 265–282.

Pereira, S. A., Alves, Â., Ferreira, V., & Teixeira, P. C. M. (2018). The impact of environmental stresses in the virulence traits of *Listeria monocytogenes* relevant to food safety. In M. A. Nyila (Ed.), *Listeria monocytogenes* (pp. 89–108). IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.73127

Pérez-Baltar, A., Alía, A., Rodríguez, A., Córdoba, J. J., Medina, M., & Montiel, R. (2020). Impact of water activity on the inactivation and gene expression of *Listeria monocytogenes* during refrigerated storage of pressurized dry-cured ham. *Foods*, *9*(8), 1092. https://doi.org/10.3390/foods9081092

Pérez-Baltar, A., Serrano, A., Medina, M., & Montiel, R. (2021) Effect of high pressure processing on the inactivation and the relative gene transcription patterns of *Listeria monocytogenes* in dry-cured ham. *LWT Journal*, *139*, 110555. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110555.

Petrus, R., Churey, J.J., & Worobo, R.W. (2020). High pressure processing of apple juice: the most effective parameters to inactivate pathogens of reference. *British Food Journal*, *122*, 3969–3979. https://doi.org/10.1108/BFJ-03-2020-0178

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, *29*(9), E45. https://doi.org/10.1093/NAR/29.9.E45

Pinto, C.A., Moreira, S.A., Fidalgo, L.G., Inácio, R.S., Barba, F.J., & Saraiva, J.A. (2020). Effects of high-pressure processing on fungi spores: Factors affecting spore germination and inactivation and impact on ultrastructure. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *19*, 553–573. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12534

Possas, A., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., & García-Gimeno, R.M. (2017). Modelling the inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure processing in foods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *70*, 45–55. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.006

Prokop, A., Gouin, E., Villiers, V., Nahori, M. A., Vincentelli, R., Duval, M., Cossart, P., & Dussurget, O. (2017). OrfX, a nucleomodulin required for *Listeria monocytogenes* virulence. *mBio*, *8*(5), e01550-17. https://doi.org/10.1128/mBio.01550-17

Quereda, J. J., Morón-García, A., Palacios-Gorba, C., Dessaux, C., Pucciarelli, M. G., & Ortega, A. D. (2021). Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes*: A trip from environmental to medical microbiology. *Virulence*, *12*(1), 2509–2545. https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1983927

Raghubeer, E. V., Phan, B. N., Onuoha, E., Diggins, S., Aguilar, V., Swanson, S., & Lee, A. (2020). The use of High-Pressure Processing (HPP) to improve the safety and quality of raw coconut (Cocos nucifera L) water. *International Journal of Food Microbiology*, *331*. Scopus. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108697

Rahman, S. (Ed.) (2020). Handbook of food preservation, Third edition. ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL. https://doi.org/10.1201/9780429091483

Rakic-Martinez, M., Drevets, D.A., Dutta, V., Katic, V., & Kathariou, S. (2011). *Listeria monocytogenes* strains selected on ciprofloxacin, or the disinfectant benzalkonium chloride exhibit reduced susceptibility to ciprofloxacin, gentamicin, benzalkonium chloride, and other toxic compounds. *AEM*, *77*, 8714–8721. https://doi.org/10.1128/aem.05941-11

Riekkinen, K., Martikainen, K., & Korhonen, J. (2023). Effectiveness of High-Pressure Processing Treatment for Inactivation of *Listeria monocytogenes* in Cold-Smoked and Warm-Smoked Rainbow Trout. *Applied Sciences*, *13*, 3735. https://doi.org/10.3390/app13063735

Ritz, M., Tholozan, J.L., Federighi, M., & Pilet, M.F. (2001). Morphological and physiological characterization of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*, 2240–2247. https://doi.org/10.1128/aem.67.5.2240-2247.2001

Ryu, J., Park, S. H., Yeom, Y. S., Shrivastav, A., Lee, S. H., Kim, Y. R., & Kim, H. Y. (2013). Simultaneous detection of *Listeria* species isolated from meat processed foods using multiplex PCR. *Food Control*, *32*(2), 659–664. https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2013.01.048

Sanlıbaba, P., Tezel, B. U., & Çakmak, G. A. (2018). Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat foods in Turkey. *Journal of Food Quality*, 7693782. https://doi.org/10.1155/2018/7693782

Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., & Griffin, P.M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, *17*, 7–15. https://doi.org/10.3201/eid1701.P11101

Scolari, G., Zacconi, C., Busconi, M., & Lambri, M. (2015). Effect of the combined treatments of high hydrostatic pressure and temperature on *Zygosaccharomyces bailii* and *Listeria monocytogenes* in smoothies. *Food Control*, *47*, 166–174. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.006

Sehrawat, R., Kaur, B.P., Nema, P.K., Tewari, S., & Kumar, L. (2021). Microbial inactivation by high pressure processing: principle, mechanism and factors responsible. *Food Science and Biotechnology*, *30*, 19–35. https://doi.org/10.1007/s10068-020-00831-6

Self, J.L., Conrad, A., Stroika, S., Jackson, A., Whitlock, L., Jackson, K.A., Beal, J., Wellman, A., Fatica, M.K., Bidol, S., Huth, P. P., Hamel, M., Franklin, K., Tschetter, L., Kopko, C., Kirsch, P., Wise, M. E., & Basler, C. (2019). Multistate outbreak of listeriosis associated with packaged leafy green salads, United States and Canada, 2015–2016.

Emerging Infectious Diseases, *25*(8), 1461–1468. https://doi.org/10.3201/eid2508.180761

Shimojima, Y., Ida, M., Nakama, A., Nishino, Y., Fukui, R., Kuroda, S., Hirai, A., Kai, A., & Sadamasu, K. (2016). Prevalence and Contamination Levels of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods in Tokyo, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, *78*, 1183–1187. https://doi.org/10.1292/jvms.15-0708

Simões Da Silva, T.M., Piazentin, A.C.M., Mendon.a, C.M.N., Converti, A., Bogsan, C.S.B., Mora, D., & De Souza Oliveira, R.P. (2020). Buffalo Milk Increases Viability and Resistance of Probiotic Bacteria in Dairy Beverages under in Vitro Simulated Gastrointestinal Conditions. *Journal of Dairy Science*, *103*, 7890–7897. https://doi.org/10.3168/jds.2019-18078

Sionek, B., Szydłowska, A., Trzaskowska, M., & Kołożyn-Krajewska, D. (2024). The Impact of Physicochemical Conditions on Lactic Acid Bacteria Survival in Food Products. *Fermentation*, 10, 298. https://doi.org/10.3390/fermentation10060298

Srinivasan, V., Nam, H. M., Nguyen, L. T., Tamilselvam, N., Murinda, S. E., & Oliver, S. P. (2005). Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms. *Foodborne Pathogens and Disease*, *2*(3), 201–211. https://doi.org/10.1089/fpd.2005.2.201

Stepanović, S., Vukovic, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of Testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by Staphylococci. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*, *115*, 891–900. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x

Sudagidan, M., Ozalp, V.C., .ztürk, O., Yurt, M.N.Z., Yavuz, O., Tasbasi, B.B., Ucak, S., Mavili, Z.S., Coban, A., & Aydin, A. (2021). Bacterial Surface, Biofilm and Virulence Properties of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Smoked Salmon and Fish Food Contact Surfaces. *Food Bioscince*, *41*, 101021. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101021

Swetha, C. S., Porteen, K., Elango, A., Ronald, B. S. M., Senthil Kumar, T. M. A., Milton, A. P., & Sureshkannan, S. (2021). Genetic diversity, virulence and distribution of antimicrobial resistance among *Listeria monocytogenes* isolated from milk, beef, and bovine farm environment. *Iranian Journal of Veterinary Research*, *22*(1), 1–8. https://doi.org/10.22099/ijvr.2020.37618.5472

Tahir, R., Rabbani, M., Ahmad, A., Tipu, M.Y., Chaudhary, M.H., & Jayarao, B.M. (2022). Study on occurrence of *Listeria monocytogenes* in soil of Punjab Province and its associated risk factors. *Journal of Animal and Plant Sciences*, *32*, 45–51. https://doi.org/10.36899/JAPS.2022.1.0400

Tasara, T., & Stephan, R. (2006). Cold Stress Tolerance of *Listeria monocytogenes*: A Review of Molecular Adaptive Mechanisms and Food Safety Implications. *Journal of Food Protection*, *69*, 1473–1484. https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.6.1473

Thomas, C.M., & Nielsen, K.M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology 3*, 711–721. https://doi.org/10.1038/nrmicro1234

Tomasula, P. M., Renye, J. A., Van Hekken, D. L., Tunick, M. H., Kwoczak, R., Toht, M., Leggett, L. N., Luchansky, J. B., Porto-Fett, A. C., & Phillips, J. G. (2014). Effect of high-pressure processing on reduction of *Listeria monocytogenes* in packaged queso fresco. *Journal of Dairy Science*, *97*(3), 1281–1295. https://doi.org/10.3168/jds.2013-7406

Valdramidis, V. P., Patterson, M. F., & Linton, M. (2015). Modelling the recovery of *Listeria monocytogenes* in high pressure processed simulated cured meat. *Food Control*, *47*, 353–358. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.028

Virtue Market Research, 2024. Europe High Pressure Processing Equipment Market Research Report – Segmentation By Pressure Range (Low-Pressure Systems (100 - 300 MPa), Mid-Pressure Systems (300 - 600 MPa), Ultra-High-Pressure Systems (600+ MPa)), By Application (Beverages, Meat, Poultry, and Seafood, Fruits, Vegetables, and Ready-to-Eat (RTE) Meals), By Vessel Orientation (Horizontal Systems, Vertical Systems), and Region; - Size, Share, Growth Analysis | Forecast (2024– 2030) (No. VMR16658). https://virtuemarketresearch.com/report/europe-high-pressure-processing-equipment-market (Dostęp 19 lutego 2026 r.)

Walczycka, M. (2005). Metody inaktywacji i hamowania wzrostu *Listeria monocytogenes* w przetworach mięsnych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2, 61–72.

Wemekamp-Kamphuis, H. H., Wouters, J. A., de Leeuw, P. P. L. A., Hain, T., Chakraborty, T., & Abee, T. (2004). Identification of sigma factor σB-controlled genes and their impact on acid stress, high hydrostatic pressure, and freeze survival in Listeria monocytogenes EGD-e. *Applied and Environmental Microbiology, 70*(6), 3457–3466. https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3457-3466.2004

Wideman, N. E., Oliver, J. D., Crandall, P. G., & Jarvis, A. N. (2021). Detection and potential virulence of viable but non-culturable (VBNC) *Listeria monocytogenes*: A review. *Microorganisms*, *9*(2), 194. https://doi.org/10.3390/microorganisms9020194

Wiktorczyk-Kapischke, N., Skowron, K., Grudlewska-Buda, K., Wałecka-Zacharska, E., Korkus, J., & Gospodarek-Komkowska, E. (2021). Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to the stress factors in the food processing environment. *Frontieers in Microbiology*, *12*, 710085. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.710085

Wiktorczyk-Kapischke, N., Wałecka-Zacharska, E., Skowron, K., Kijewska, A., Bernaciak, Z., Bauza-Kaszewska, J., Kraszewska, Z., & Gospodarek-Komkowska, E. (2022). Comparison of selected phenotypic features of persistent and sporadic strains of *Listeria monocytogenes* sampled from fish processing plants. *Foods*, *11*, 1492. https://doi.org/10.3390/foods11101492

Wilson, A., Gray, J., Chandry, P.S., & Fox, E.M. (2018). Phenotypic and genotypic analysis of antimicrobial resistance among *Listeria monocytogenes* isolated from Australian food production chains. *Genes*, *9*, 80. https://doi.org/10.3390/genes9020080

Wiśniewski, P., Zakrzewski, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., & Zadernowska, A. (2024). Possibility of Transfer and Activation of "silent" Tetracycline Resistance Genes among *Enterococcus faecalis* under High-Pressure Processing. *Food Microbiology*, *120*, 104481. https://doi.org/10.1016/j.fm.2024.104481

World Health Organization (WHO). Listeriosis-South Africa. Dostępny online: https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/28-march-2018-listeriosis-south-africa-en (dostęp: 22 lutego 2026 r.).

World Health Organization (WHO). Listeriosis–Spain. Dostępny online: https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2019-DON256 (dostęp: 22 lutego 2026 r.).

Zacconi, C., Giosue, S., Marudelli, M., & Scolari, G. (2015). Microbiological quality and safety of smoothies treated in different pressure-temperature domains: effects on indigenous fruit microbiota and *Listeria monocytogenes* and their survival during storage. *European Food Research and Technology*, *241*, 317–328. https://doi.org/10.1007/s00217-015-2460-8

Zakrzewski, A. J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., & Podlasz, P. (2020). Virulence characterization of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, and *Listeria welshimeri* isolated from fish and shrimp using in vivo early zebrafish larvae models

and molecular study. *Pathogens, 9*(12), 1028. https://doi.org/10.3390/pathogens9121028

Zakrzewski, A. J., Kurpas, M., Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., & Fraqueza, M. J. (2023). A Comprehensive Virulence and Resistance Characteristics of *Listeria monocytogenes* Isolated from Fish and the Fish Industry Environment. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(4). Scopus. https://doi.org/10.3390/ijms24043581

Zarzecka, U., Chajęcka-Wierzchowska, W., & Zadernowska, A. (2022). Microorganisms from starter and protective cultures – Occurrence of antibiotic resistance and conjugal transfer of *tet* genes in vitro and during food fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, *153*, 112490. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112490

Zhao, S., Pan, Z., Azarakhsh, N., Ramaswamy, H.S., Duan, H., & Wang, C. (2023). Effects of high-pressure processing on the physicochemical and adsorption properties, structural characteristics, and dietary fiber content of kelp (*Laminaria japonica*). *Current Research in Food Science*, *8*, 100671. https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100671

Zhao, X., Zhong, J., Wei, C., Lin, C.-W., & Ding, T. (2017). Current perspectives on viable but nonculturable state in foodborne pathogens. *Frontiers in Microbiology, 8,* 580. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00580

Zhou, K., Zhu, D., Tao, Y., Xie, L., Han, L., Zhang, Y. & Sun, J. (2019). New genetic context of *lnu*(B) composed of two multi-resistance gene clusters in clinical *Streptococcus agalactiae* ST-19 strains. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, *8*, 117. https://doi.org/10.1186/s13756-019-0569-1

Zhu, Q., Gooneratne, R., & Hussain, M. (2017). *Listeria monocytogenes* in Fresh Produce: Outbreaks, Prevalence and Contamination Levels. *Foods*, *6*, 21. https://doi.org/10.3390/foods6030021

CAŁKOWITE ZESTAWIENIE DOROBKU NAUKOWEGO

Stan na dzień – 04.06.2026 r.

Artykuły naukowe opublikowane w recenzowanych czasopismach znajdujących się w wykazie MNiSW

1. Trymers, M., **Wiśniewski, P.,** Tkacz, K., & Zakrzewski, A. (2026) From Production to Application: Postbiotics in Meat, Meat Products, Other Food Matrices, and Bioactive Packaging. *Foods*, *15*(3), 501. https://doi.org/10.3390/foods15030501 **(MNSiW$_{2026}$ – 100, IF – 5.1) – autor korespondencyjny.**
2. **Wiśniewski, P.,** Adamski, P., Trymers, M., Chajęcka-Wierzchowska, W., & Zadernowska, A. (2025). Predicting Antibiotic Resistance in *Listeria monocytogenes* from Food and Food-Processing Environments Using Next-Generation Sequencing: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(20), 10112. https://doi.org/10.3390/ijms262010112. **(MNSiW$_{2025}$ – 140, IF – 4.9) autor korespondencyjny.**
3. **Wiśniewski, P.,** & Barbieri, F. (2025). Molecular Identification and Biogenic Amine Production Capacity of *Enterococcus faecalis* Strains Isolated from Raw Milk. *Journal of Molecular Sciences*, 26(21), 10480. https://doi.org/10.3390/ijms262110480. **(MNSiW$_{2025}$ – 140, IF – 4.9) autor korespondencyjny.**
4. **Wiśniewski P.,** & Zadernowska A. (2026). Application of pascalisation in the control of *Listeria* sp. in beverages – effectiveness, limitations, and future prospects. Food Microbiology https://doi.org/10.1016/j.fm.2025.104932 **(MNSiW$_{2025}$ – 140, IF – 4.6) autor korespondencyjny.**
5. **Wiśniewski, P.**, Małkowska-Kowalczyk, M., Łobacz, A., Zadernowska, A., & Żulewska, J. (2025). Invited review: Milk-clotting enzymes of microbial origin and their role in cheesemaking-A review. *Journal of Dairy Science*, 108(10). https://doi.org/10.3168/jds.2025-26973. **(MNSiW$_{2025}$ – 200, IF – 4.4) autor korespondencyjny.**
6. **Wiśniewski, P.,** Adamski, P., Chajęcka-Wierzchowska, W., & Zadernowska, A. (2025). Role of osmotic stress in modulating antibiotic resistance and adhesion properties of *Listeria monocytogenes* in a dairy factory environment. *Journal of Dairy Science*, 108(11). https://doi.org/10.3168/jds.2025-26971. **(MNSiW$_{2025}$ – 200, IF – 4.4).**

7. Adamski, P., Zakrzewski, A., **Wiśniewski, P.,** Chajęcka-Wierzchowska, W., & Zadernowska, A. (2025) High-pressure processing (HPP) alters tetracycline resistance in *Listeria monocytogenes*: A phenotypic and genotypic study. *NFS Journal*, *38*, 100223. http://dx.doi.org/10.1016/j.nfs.2025.100223. **(MNSiW$_{2025}$ – 140, IF – 3.3).**
8. **Wiśniewski, P.,** Trymers, M., & Tkacz, K. (2025). Wybrane metody pakowania mięsa i produktów mięsnych - wypływ na ich jakość, trwałość i bezpieczeństwo. *Gospodarka Mięsna*, *4*, 48-51. **(MNSiW$_{2025}$ – 20) – autor korespondencyjny.**
9. Trymers, M., **Wiśniewski, P.,** & Tkacz, K. (2025) Nietermiczne metody przedłużania trwałości mięsa i produktów mięsnych. Gospodarka Mięsna, *1,* 21-23. **(MNSiW$_{2025}$ – 20).**
10. **Wiśniewski, P.,** Trymers, M., Chajęcka-Wierzchowska, W., Tkacz, K., Zadernowska, A., & Modzelewska-Kapituła, M. (2024). Antimicrobial Resistance in the Context of Animal Production and Meat Products in Poland – A Critical Review and Future Perspective. *Pathogens*, *13*, 1123. https://doi.org/10.3390/pathogens13121123. **(MNSiW$_{2024}$ – 100, IF – 3.3) – autor korespondencyjny.**
11. Purkiewicz A., **Wiśniewski P.,** Tańska M., Goksen G., & Pietrzak-Fiećko R. (2024). Effect of the Storage Conditions on the Microbiological Quality and Selected Bioactive Compound Content in Fruit Mousses for Infants and Young Children, *Applied Science*, *14*(23), 11347. https://doi.org/10.3390/app142311347. **(MNSiW$_{2024}$ – 100, IF – 2.5) – autor korespondencyjny.**
12. **Wiśniewski P.,** Chajęcka-Wierzchowska W. & Zadernowska A. (2024). High-Pressure Processing Influences Antibiotic Resistance Gene Transfer in *Listeria monocytogenes* Isolated from Food and Processing Environments, *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(23), 12964. https://doi.org/10.3390/ijms252312964. **(MNSiW$_{2024}$ – 140, IF – 4.9)**
13. **Wiśniewski P.,** Zakrzewski A., Chajęcka-Wierzchowska W., & Zadernowska A. (2024). Possibility of transfer and activation of 'silent' tetracycline resistance genes among *Enterococcus faecalis* under high-pressure processing, *Food Microbiology*, 120, 104481. https://doi.org/10.1016/j.fm.2024.104481. **(MNSiW$_{2024}$ – 140, IF – 4.6) – autor korespondencyjny.**
14. **Wiśniewski, P.,** Chajęcka-Wierzchowska, W., & Zadernowska, A. (2024). Impact of High-Pressure Processing (HPP) on *Listeria monocytogenes*-An Overview of Challenges and Responses. *Foods*, *13*(14). https://doi.org/10.3390/foods13010014. **(MNSiW$_{2023}$ – 140, IF – 5.1) – autor korespondencyjny.**

15. **Wiśniewski, P.,** Gajewska, J., Zadernowska, A., & Chajęcka-Wierzchowska, W. (2024). Identification of the Enterotoxigenic Potential of *Staphylococcus* spp. from Raw Milk and Raw Milk Cheeses. *Toxins*, *16*(17). https://doi.org/10.3390/toxins16010017. **(MNSiW$_{2023}$ – 140, IF – 4.0) – autor korespondencyjny.**
16. **Wiśniewski, P.,** Chajęcka-Wierzchowska, W., & Zadernowska, A. 2023. High-Pressure Processing – Impacts on the Virulence and Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolated from Food and Food Processing Environments. *Foods*, 12(21), 3899. https://doi.org/10.3390/foods12213899. **(MNSiW$_{2023}$ – 140, IF – 5.1) – autor korespondencyjny.**
17. **Wiśniewski P.,** & Zarzecka U. 2023. Właściwości funkcjonalne bakterii fermentacji mlekowej (LAB) w produkcji wyrobów mleczarskich. *Przegląd mleczarski*, 4, s. 6-10. ISSN 0478-6599 **(MNSiW$_{2023}$ – 40).**
18. Zakrzewski A., Purkiewicz A., Jakuć P., **Wiśniewski P.,** Sawicki T., Chajęcka-Wierzchowska W., & Tańska M. (2022). Effectiveness of various solvent-produced thyme (*Thymus vulgaris*) extracts in inhibiting the growth of *Listeria monocytogenes* in frozen vegetables. *NFS Journal*, 29, 26-34. https://doi.org/10.1016/j.nfs.2022.09.004. **(MNSiW$_{2022}$ – 140, IF – 3.3).**
19. **Wiśniewski P.,** Zakrzewski A.J., Zadernowska A., & Chajęcka-Wierzchowska W. (2022). Antimicrobial Resistance and Virulence Characterization of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Food and Food Processing Environments. Pathogens, *11*(10), 1099. https://doi.org/10.3390/pathogens11101099. **(MNSiW$_{2022}$ – 100, IF – 3.3) – autor korespondencyjny.**
20. Chajęcka-Wierzchowska W., Gajewska J., **Wiśniewski P.,** & Zadernowska A. (2020). Enterotoxigenic Potential of Coagulase-Negative Staphylococci from Ready-to-Eat Food. Pathogens, *9*(9), 734. https://doi.org/10.3390/pathogens9090734. **(MNSiW$_{2020}$ – 100, IF – 3.3).**
21. **Wiśniewski P.,** & Chajęcka-Wierzchowska W. (2020). Mleko i produkty mleczne jako potencjalne źródło enterotoksyn gronkowcowych. *Przemysł Spożywczy*, *74*(10), 24-27. http://dx.doi.org/10.15199/65.2020.10.4. **(MNSiW$_{2020}$ – 20).**

Artykuły naukowe opublikowane w czasopismach naukowych nie ujętych w wykazie MNiSW:

1. **Wiśniewski P.,** & Chajęcka-Wierzchowska W. (2020). Mleko i produkty mleczarskie jako źródło pałeczek *Listeria monocytogenes* w krajach UE. *Przegląd mleczarski*, *12*, 16-21. **(MNSiW$_{2020}$ – 5).**

Rozdziały w monografiach pokonferencyjnych

1. Wiśniewski, P., & Zadernowska, A. (2026). Analiza skuteczności paskalizacji wobec *Listeria monocytogenes* w napojach. W: Młodzi naukowcy 2.0. DOI: https://doi.org/10.14254/978-83-979051-2-2/2026 **(MNSiW$_{2026}$ – 80).**
2. Trymers M., **Wiśniewski P.,** Włodarczyk W., Tkacz K., Modzelewska-Kapituła M., Tkaczewska J., & Jamróz E. (2025). Zastosowanie powłoki polisacharydowo-białkowej z dodatkiem rozmarynu do przedłużenia trwałości łososia atlantyckiego (*Salmo salar*) przechowywanego w warunkach chłodniczych. XLVII Sesja Naukowa Komitetu Nauk o Żywności i Żywieniu PAN Doskonalenie Żywności i Żywienia Dla Zachowania Komfortu Życia Człowieka Olsztyn. **(MNSiW$_{2025}$ – 80).**
3. Małkowska-Kowalczyk M., **Wiśniewski P.,** Łobacz A., & Żulewska J. (2025). Enzymy mikrobiologiczne w przemyśle mleczarskim – możliwości i ograniczenia. XLVII Sesja Naukowa Komitetu Nauk o Żywności i Żywieniu PAN Doskonalenie Żywności i Żywienia Dla Zachowania Komfortu Życia Człowieka Olsztyn. **(MNSiW$_{2025}$ – 80).**
4. Adamski, P., & **Wiśniewski P.** (2025). Wpływ stresu osmotycznego na fenotypową oporność na antybiotyki oraz zdolność tworzenia biofilmów przez pałeczki *Listeria monocytogenes* wyizolowane z zakładu przetwórstwa żywności. Młodzi Liderzy Jakości. Instytut Nauk o Jakości Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu. ISBN 978-83-973289-0-7. **(MNSiW$_{2025}$ – 20).**
5. **Wiśniewski P.,** & Adamski P. (2024). Oporność na antybiotyki pałeczek *Listeria monocytogenes* izolowanych z żywności. *Młodzi Liderzy Jakości*, Instytut Nauk o Jakości Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu. ISBN: 978-83-960669-5-4. **(MNSiW$_{2024}$ – 5).**
6. **Wiśniewski P.,** & Zadernowska A. (2023). Występowanie 'cichych' genów oporności na antybiotyki u szczepów *Listeria monocytogenes* pochodzących z żywności, w: *Młodzi Naukowcy 2.0 Tom III*, pod redakcją: Jarosław Korpysa, Paulina Niedźwiedzka-Rystwej,

Artur Łabuz, Patrycja Bełtowska, Fundacja Centrum Badań Socjologicznych, **(MNSiW$_{2023}$ – 80).**

7. **Wiśniewski P.** (2023). Zdolność wytwarzania amin biogennych przez izolaty *Enterococcus faecalis* z surowego mleka, *Młodzi Liderzy Jakości*, Instytut Nauk o Jakości Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu. ISBN: 978-83-960669-5-4. **(MNSiW$_{2023}$ – 20).**
8. Gajewska J., & **Wiśniewski P.** (2020). Jakość mikrobiologiczna niepasteryzowanych soków owocowych i warzywnych, W: Mogielnicka-Brzozowska M. *Ekologia żywności, środowiska i zdrowia człowieka*. Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych w Olsztynie. Tom 1, s. 292-302. Poznań, Wydawnictwo Naukowe FNCE, 2020. ISBN 78-83-66264-54-0 **(MNSiW$_{2020}$ – 20).**
9. **Wiśniewski P.,** & Zakrzewski A. (2020). Podobieństwo fenotypowe pałeczek *Listeria monocytogenes* izolowanych z warzyw mrożonych, W: Mogielnicka-Brzozowska M. *Ekologia żywności, środowiska i zdrowia człowieka*. Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych w Olsztynie. Tom 1, s. 405-414. Poznań, Wydawnictwo Naukowe FNCE. ISBN 78-83-66264-54-0. **(MNSiW$_{2020}$ – 20).**
10. Zakrzewski A., **Wiśniewski P.,** Purkiewicz A., & Jakuć P. (2020). The ability of *Listeria monocytogenes* isolated from frozen vegetables to form biofilm, Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce Żywność i żywienie, Poznań ISBN 978-83-66743-18-2. **(MNSiW$_{2020}$ – 5).**
11. Jakuć P., Purkiewicz A., Zakrzewski A., & **Wiśniewski P.** (2020). Phenolic content and antioxidant activity of thyme extracts (*Thymus vulgaris* L.) obtained with various solvents. *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce*. Poznań ISBN 978-83-66743-18-2. **(MNSiW$_{2020}$ – 5).**
12. **Wiśniewski P.,** & Górecka I. (2019). Ocena stopnia zanieczyszczenia mleka i produktów mleczarskich aflatoksyną M1. *Uwarunkowania bezpieczeństwa i jakości żywności w Polsce* / pod redakcją Wojciecha Truszkowskiego, Patrycji Róży Sosny, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, s. 175-183. ISBN 978-83-956298-0-8 **(MNSiW$_{2019}$ – 20).**
13. **Wiśniewski P., &** Górecka I. 2019. Owoce roślin egzotycznych i ich prozdrowotne właściwości. Poznań: Młodzi Naukowcy. ISBN 978-83-66139-81-7, s. 181-186 **(MNSiW$_{2019}$ – 5).**
14. **Wiśniewski P.** (2018). Żywność typu ready-to-eat (RTE) jako źródło pałeczek *Listeria monocytogenes* w krajach UE. W: *Koła naukowe – szkołą twórczego działania. Tom 4.*

Nauki rolnicze i weterynaryjne, część 2/ [red. nauk. Małgorzata Tańska i Patrycja Sosna]. Wydawnictwo ABADA, s. 247-259 **(MNSiW$_{2018}$ – 5).**

15. **Wiśniewski P.,** & Biernaciak Ł. (2018). Ocena wpływu warunków ekstrakcji na zawartość szczawianów rozpuszczalnych w wybranych naparach herbacianych i kawowych. *XIII Dni Młodych Towaroznawców*. Wydział Towaroznawstwa, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu, s. 163-166. ISBN 978-83-948206-3-3 **(MNSiW$_{2018}$ – 5).**
16. **Wiśniewski P.** (2017). Zawartość kofeiny w wybranych napojach energetyzujących. *Koła naukowe - szkołą twórczego działania: nauki rolnicze, T. 1* / pod red. I. Szatrawskiej, K. Szatrawskiego i M. Gołębiewskiej, Wydawnictwo ABADA, 63-70. **(MNSiW$_{2017}$ – 5).**
17. Wiśniewska N., & **Wiśniewski P.** (2017). Analiza zawartości szczawianów w naparach wybranych herbat i kaw. *XII Dni Młodych Towaroznawców*. Wydział Towaroznawstwa, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu, s. 193-196. ISBN 978-83-943304-5-3. **(MNSiW$_{2017}$ – 5).**
18. **Wiśniewski P.** (2017). Analiza olsztyńskiego rynku słonych przekąsek pod kątem obecności substancji wzmacniających smak. *XII Dni Młodych Towaroznawców*. Wydział Towaroznawstwa, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu, s. 197-200, ISBN 978-83-943304-5-3. **(MNSiW$_{2017}$ – 5).**
19. Wiśniewska N., & **Wiśniewski P.** 2016. Substancje konserwujące w wybranych produktach z grupy żywności wygodnej. *Koła Naukowe – szkołą twórczego działania, Tom 5*. XLV Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych s. 99-104. ISBN 978-83-65171-30-6. **(MNSiW$_{2017}$ – 5).**

Uzyskane i realizowane projekty naukowe

1. Projekt: *Rola postbiotyków w rozprzestrzenianiu się genów oporności na antybiotyki: implikacje dla bakterii komensalnych i chorobotwórczych*. **OPUS (NCN)** (2025/57/B/NZ9/01829). Okres realizacji: 01.05.2026 r. – 30.11.2026 r., pełniona funkcja: **wykonawca**.
2. Projekt: *Opracowanie bioochronnego preparatu z inaktywowanych szczepów o niskim indeksie MAR i obniżonym potencjale transferu genów w ramach strategii One Health – poprawa trwałości żywności i kontrola zanieczyszczeń Listeria monocytogenes.* **LIDER (NCBiR) (15/0216/2024)**. Okres realizacji: 10.2025–04.2027, pełniona funkcja: **wykonawca**.

3. Projekt: *Potencjał i mechanizmy zmiany wrażliwości na antybiotyki u Listeria monocytogenes w warunkach stresu wywołanego paskalizacją.* **PRELUDIUM 23** (NCN) (2024/53/N/NZ9/00833). Okres realizacji: 2025–2028, pełniona funkcja: **kierownik projektu**.
4. Projekt: *Wpływ zastosowania enzymów koagulujących mleko pozyskanych z mikrobioty Jiuqu na mechanizm koagulacji mleka i kształtowanie cech jakościowych sera*. **OPUS 22** (NCN) (2021/43/B/NZ9/01111). Okres realizacji: 2024–2025, pełniona funkcja: **wykonawca (stypendysta)**.
5. Projekt: *Wpływ technologii płotków i obróbki sous-vide na ekspresję czynników wirulencji i genów oporności na antybiotyki u Listeria monocytogenes i Enterococcus sp.* **OPUS 15** (NCN) (2018/29/B/NZ9/00645). Okres realizacji: 2023, pełniona funkcja: **wykonawca**.
6. Projekt: *Ilościowa ocena lekowrażliwości drobnoustrojów oraz wykrywanie mechanizmów oporności z zastosowaniem systemu BacterOMIC® w odniesieniu do metody referencyjnej*. koordynator projektu z ramienia UWM: dr hab. inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska, prof. UWM. Okres realizacji 06-09.2021, pełniona funkcja: **wykonawca**.
7. Projekt: *Zjadliwość, enterotoksyczność i antybiotykooporność szczepów gronkowców koagulazo-ujemnych izolowanych z żywności z uwzględnieniem możliwości horyzontalnego transferu genów*. **SONATA 12** (NCN) (2016/23/D/NZ9/01404). Okres realizacji: 2020–2021, pełniona funkcja: **wykonawca**.
8. Projekt: *Ekstrakty z tymianku właściwego (Thymus vulgaris) jako naturalna alternatywa dla konserwantów w walce z patogenami Listeria monocytogenes w mrożonkach warzywnych.* **Studencki Grant Rektora – Edycja III (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie).** Okres realizacji: 2020–2022, pełniona funkcja: **wykonawca**.

Doniesienia na konferencjach naukowych

1. Trymers M., & **Wiśniewski P**. Wpływ hydrożelu na bazie oleju lnianego na jakość kiełbasy typu chorizo. XXX Sesja Naukowa Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ „Żywność zrównoważona – perspektywy i wyzwania", Rzeszów (21-22.05.2026 r.).
2. **Wiśniewski P.**, & Trymers M. Aktywaność antybakteryjna postbiotyków. XXX Sesja Naukowa Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ „Żywność zrównoważona – perspektywy i wyzwania", Rzeszów (21-22.05.2026 r.).

3. Zdrojewski B., & **Wiśniewski P.** Potencjał wrażliwości na antybiotyki szczepów *Listeria monocytogenes* wyizolowanych z żywności. VII Międzynarodowe Sympozjum Studenckich Kół Naukowych, Lublin (16.04.2026 r.)
4. **Wiśniewski P.,** Adamski P., Trymers M., Chajęcka-Wierzchowska W., & Zadernowska A. Predicting antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes* from food and food-processing environments using next-generation sequencing. 6th Annual International Congress of Doctoral Students, Universitas Miguel Hernandez (05-06.02.2026 r.).
5. Trymers M., Tkacz K., Kłebukowska L., **Wiśniewski P.** Essential oils as alternative preservative agents in poultry meat processing. 6th Annual International Congress of Doctoral Students, Universitas Miguel Hernandez (05-06.02.2026 r.).
6. Purkiewicz A., **Wiśniewski P.,** Kaczmarczyk M., Ciborska J., & Tońska E. Characterization of selected bioactive and microbiological properties of fermented vegetable juices. Agriculture & Food 13th International Conference Burgas, Bulgaria. (11-14 Sierpnia 2025).
7. Trymers M., **Wiśniewski P.,** Włodarczyk W., Tkacz K., Modzelewska-Kapituła M., Tkaczewska J., & Jamróz E. Zastosowanie powłoki polisacharydowo-białkowej z dodatkiem rozmarynu do przedłużeniu trwałości łososia atlantyckiego (*Salmo salar*) przechowywanego w warunkach chłodniczych. XLVII Sesja Naukowa Komitetu Nauk o Żywności i Żywieniu PAN Doskonalenie Żywności i Żywienia Dla Zachowania Komfortu Życia Człowieka Olsztyn. (3-4 lipca 2025 r.).
8. Małkowska-Kowalczyk M., **Wiśniewski P.,** Łobacz A., & Żulewska J. Enzymy mikrobiologiczne w przemyśle mleczarskim – możliwości i ograniczenia. XLVII Sesja Naukowa Komitetu Nauk o Żywności i Żywieniu PAN Doskonalenie Żywności i Żywienia Dla Zachowania Komfortu Życia Człowieka Olsztyn. (3-4 lipca 2025 r.).
9. **Wiśniewski P.** Analiza skuteczności paskalizacji wobec *Listeria monocytogenes* w napojach. Konferencja: V Międzynarodowa Multidyscyplinarna Konferencja Doktorantów Uniwersytetu Szczecińskiego. (25-27.06.2025 r.).
10. Adamski P., & **Wiśniewski P.** Wpływ stresu osmotycznego na fenotypową oporność na antybiotyki oraz zdolność tworzenia biofilmów przez pałeczki *Listeria monocytogenes* wyizolowane z zakładu przetwórstwa żywności. Konferencja: V Dni Młodych Liderów Jakości. (10.06.2025 r.).
11. **Wiśniewski P.,** Chajęcka-Wierzchowska W., & Zadernowska A. Rola matrycy żywnościowej w transferze genów oporności na antybiotyki u *Listeria monocytogenes* pod

wpływem paskalizacji. Konferencja: XXIX Sesja Naukowa Sekcji Młodej Kadry Naukowe "Żywność w oczach młodego pokolenia". (29-30.05.2025 r.).

12. Adamski P., Zakrzewski A., **Wiśniewski P.,** Chajęcka-Wierzchowska W., & Zadernowska A. High-Pressure Processing (HPP) Alters Tetracycline Resistance in *Listeria monocytogenes*: A Phenotypic and Genotypic Study. Advancements in Microbiology. (7–9 kwietnia 2025 r.).
13. **Wiśniewski P.,** & Trymers M. Antybiotykooporność mikroorganizmów izolowanych z mięsa i produktów mięsnych w Polsce. XI Forum Młodych Naukowców Nauki przyrodnicze i medyczne. (06-07.12.2024 r.).
14. Trymers M., & **Wiśniewski P.** Wpływ procesów technologicznych na poziom pozostałości antybiotyków w mięsie i produktach mięsnych, XI Forum Młodych Naukowców Nauki przyrodnicze i medyczne. (06-07.12.2024 r.).
15. **Wiśniewski P.,** Chajęcka-Wierzchowska W., & Zadernowska A. Wpływ technologii wysokich ciśnień na ekspresję cichych genów oporności na antybiotyki u *Listeria monocytogenes*. XXI Konferencja Naukowa Młodych Badaczy Bezpieczeństwo i jakość żywności. (19.11.2024 r.).
16. Radomski P., & **Wiśniewski P.** Profile oporności na antybiotyki szczepów *Listeria monocytogenes* wyizolowanych ze środowiska produkcji żywności. XV Międzynarodowa Konferencja Studenckich Kół Naukowych „Współczesne aspekty zagrożeń zdrowia", Akademia Nauk Stosowanych w Nowym Targu. (28.05.2024 r.).
17. Radomski P., & **Wiśniewski P.** Wpływ warunków stresowych na zmiany oporności na antybiotyki u szczepów *Enterococcus* sp. Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców nt. Zagadnienia i Problemy Badawcze Wyzwania dla Młodych Naukowców. (15.11.2024 r.).
18. Adamski P., & **Wiśniewski P.** Oporność na antybiotyki pałeczek Listeria monocytogenes izolowanych z żywności. IV Dni Młodych Liderów Jakości, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu. (21.05.2024 r.).
19. **Wiśniewski P.** Znaczenie stresu wywołanego działaniem technologii wysokich ciśnień w regulacji oporności na antybiotyki u szczepów *Listeria monocytogenes*. XXVIII Sesji Naukowej Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ pt. „Żywność wobec wyzwań współczesnego świata". (16.05.2024 r.).
20. Radomski P., & **Wiśniewski P.** Potencjał enterotoksyczności gronkowców izolowanych z żywności. XXVIII Sesji Naukowej Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ pt. „Żywność wobec wyzwań współczesnego świata". (16.05.2024 r.).

21. Radomski P., & **Wiśniewski P.** Wpływ warunków przechowywania na jakość mikrobiologiczną musów owocowych, sesja posterowa: wKOŁO Mikrobiologii – konferencja z okazji 20. Rocznicy założenia SKN Mikrobiologii UW, Warszawa. (01.12.2023 r.).
22. **Wiśniewski P.** Znaczenie stresu wywołanego działaniem technologii wysokich ciśnień w regulacji oporności na antybiotyki u szczepów *Listeria monocytogenes.* XV Konferencji Naukowej z cyklu „Żywność XXI wieku" Żywność jako wyzwanie dla współczesnej nauki i przemysłu. (21-22.09.2023 r.).
23. **Wiśniewski P.** "Ciche" geny oporności na tetracykliny u *Enterococcus faecalis* - możliwość transferu i ekspresji pod wpływem paskalizacji. XV Konferencji Naukowej z cyklu „Żywność XXI wieku" Żywność jako wyzwanie dla współczesnej nauki i przemysłu. (21-22.09.2023 r.).
24. **Wiśniewski P.** Występowanie 'cichych' genów oporności na antybiotyki u szczepów *Listeria monocytogenes* pochodzących z żywności. II Międzynarodowa Multidyscyplinarna Konferencja Doktorantów Uniwersytetu Szczecińskiego. (21-23.06.2023 r.).
25. **Wiśniewski P.** Zdolność wytwarzania amin biogennych przez izolaty *Enterococcus faecalis* z surowego mleka, Młodzi Liderzy Jakości 2023 Instytut Nauk o Jakości Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu, POZNAŃ 2023. (01-02.06.2023 r.).
26. **Wiśniewski P.,** Zarzecka U., Zadernowska A. Zdolność wytwarzania amin biogennych przez szczepy *Enterococcus* ssp. pochodzące z żywności. II Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Żywność i Żywienie w Pigułce". (22.04.2023 r.).
27. **Wiśniewski P.** Wpływ technologii wysokich ciśnień na ekspresję genów oporności na tetracykliny u izolatów *Enterococcus faecalis* wyizolowanych ze świeżych ryb. V Konferencja Doktorantów „Cztery żywioły – Współczesne Problemy w Naukach o Życiu". (14.12.2022 r.).
28. **Wiśniewski P.,** Zakrzewski A., Zadernowska A., & Chajęcka-Wierzchowska W. Antimicrobial resistance characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environments. International Conference of Food Technology and Biology, Biochemistry and Biotechnology Sciences „PROTEINA". (13.08.2022 r.).
29. **Wiśniewski P.** Ocena zdolności tworzenia biofilmu przez szczepy *Listeria monocytogenes* pochodzące z żywności i środowiska jej produkcji. Dni Młodych Liderów Jakości, XVII Forum Studenckich Kół Naukowych. (9-10 czerwca 2022 r.).

30. **Wiśniewski P.,** Zakrzewski A, Chajęcka-Wierzchowska W., & Zadernowska A., Wpływ paskalizacji na przeżywalność pałeczek *Listeria monocytogenes*., XVIII Konferencja Naukowa Młodych Badaczy „Bezpieczeństwo i jakość żywności". (28.09.2021 r.).
31. **Wiśniewski P.,** Zdolność wytwarzania amin biogennych przez szczepy *Enterococcus* ssp. pochodzące z żywności. II Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Żywność i Żywienie w Pigułce". (22.04.2023 r.).
32. **Wiśniewski P.,** & Zakrzewski A., Podobieństwo fenotypowe pałeczek *Listeria monocytogenes* izolowanych z warzyw mrożonych. 49. Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych w Olsztynie. (24-25.09.2020 r.).
33. Gajewska J., & **Wiśniewski P.** Jakość mikrobiologiczna niepasteryzowanych soków owocowych i warzywnych. 49. Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych w Olsztynie. (24-25.09.2020 r.).
34. **Wiśniewski P.** "Ciche" geny oporności na tetracykliny u *Enterococcus faecalis* - możliwość transferu i ekspresji pod wpływem paskalizacji. XV Konferencja Naukowa z cyklu "Żywność XXI wieku" pt. Żywność jako wyzwanie dla współczesnej nauki i przemysłu, Kraków, 21-22.09.2023 r, 2023, Kraków, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie. (21-22.09.2023 r.).
35. **Wiśniewski P.** Żywność typu ready-to-eat (RTE) jako źródło pałeczek *Listeria monocytogenes* w krajach UE. Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych w Olsztynie. (26-27.04.2018 r.).
36. **Wiśniewski P.,** & Biernaciak Ł. Ocena wpływu warunków ekstrakcji na zawartość szczawianów rozpuszczalnych w wybranych naparach herbacianych i kawowych. XIII Dni Młodych Towaroznawców, Wydział Towaroznawstwa, Uniwersytet Ekonomiczny, Poznań. (07-08.06.2018 r.).
37. **Wiśniewski P.** Zawartość kofeiny w wybranych napojach energetyzujących. Koła naukowe - szkołą twórczego działania: nauki rolnicze, XVI Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych, Olsztyn. (24-25.04.2017 r.).
38. **Wiśniewski P.**, Wiśniewska N. Substancje konserwujące w wybranych produktach z grupy żywności wygodnej. Koła Naukowe – szkołą twórczego działania, Tom 5, XLV Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych. (25-26.04.2016 r.).

Opieka naukowa:

1. **Opiekun naukowy** wystąpienia na XXX Międzynarodowej Konferencji Studenckich Kół Naukowych (XLII Sejmik SKN), organizowanej w dniu 21 maja 2026 r. przez Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu. Autor wystąpienia: Aurora Jaworska. Naukowe Koło Mikrobiologii Żywności „Kocuria", Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie. Tytuł wystąpienia: Antioxidant Potential of Postbiotics.

Najważniejsze nagrody, wyróżnienia i osiągnięcia naukowe:

1. Wyróżnienie **Editor's Choice Article for Q1 2026** przyznane przez czasopismo *Foods* dla artykułu pt. *From Production to Application: Postbiotics in Meat, Meat Products, Other Food Matrices, and Bioactive Packaging*. Data – 04.06.2026 r.
2. **Wyróżnienie** – Zajęcie III miejsca w sesji komunikatowej pt. „Potencjał wrażliwości na antybiotyki szczepów *Listeria monocytogenes* wyizolowanych z żywności" Data – 16.04.2026 r.
3. **Wyróżnienie** – za najlepiej przygotowaną prezentację pt. „Potencjał wrażliwości na antybiotyki szczepów *Listeria monocytogenes* wyizolowanych z żywności" Data – 16.04.2026 r.
4. **Wyróżnienie**– Zajęcie I miejsca w konkursie „Wybitna praca naukowa" za wyróżniającą się publikację naukową. Organizator – Polskie Towarzystwo Technologów Żywności, Oddział w Olsztynie. Rok – 2025.
5. **Wyróżnienie** – Zajęcie I miejsca w konkursie dla młodych naukowców za wyróżniającą się publikację z zakresu mikrobiologii. Organizator – Polskie Towarzystwo Mikrobiologów, Oddział w Olsztynie. Rok – 2025.
6. Wyróżnienie **Editor's Choice** przyznane przez czasopismo *Pathogens* dla artykułu pt. *Antimicrobial Resistance in the Context of Animal Production and Meat Products in Poland-A Critical Review and Future Perspective.* Rok – 2025.
7. **Wyróżnienie** – Zajęcie I miejsca w sesji komunikatowej za wystąpienie pt. „Antybiotykooporność mikroorganizmów izolowanych z mięsa i produktów mięsnych w Polsce". Konferencja – XI Forum Młodych Naukowców – Nauki przyrodnicze i medyczne (zasięg międzynarodowy). Forma – prezentacja; samodzielność – indywidualnie. Data – 06–07.12.2024.

8. **Wyróżnienie** – Zajęcie I miejsca (najlepszy referat konferencji) w sesji komunikatowej za wystąpienie pt. „Wpływ technologii wysokich ciśnień na ekspresję cichych genów oporności na antybiotyki u *Listeria monocytogenes*". Konferencja – XXI Konferencja Naukowa Młodych Badaczy „Bezpieczeństwo i jakość żywności" (zasięg ogólnopolski). Forma – prezentacja; samodzielność – indywidualnie. Data – 19.11.2024.
9. **Wyróżnienie** – Zajęcie II miejsca w sesji komunikatowej za wystąpienie pt. „Profile oporności na antybiotyki szczepów Listeria monocytogenes wyizolowanych ze środowiska produkcji żywności". Konferencja – XV Międzynarodowa Konferencja Studenckich Kół Naukowych „Współczesne aspekty zagrożeń zdrowia" (ogólnopolska). Forma – prezentacja; samodzielność – zespołowo. Data – 28.05.2024.
10. **Wyróżnienie** – Zajęcie III miejsca w sesji komunikatowej za wystąpienie pt. „Oporność na antybiotyki pałeczek Listeria monocytogenes izolowanych z żywności". Konferencja – IV Dni Młodych Liderów Jakości, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu (ogólnopolska). Forma – prezentacja; samodzielność – zespołowo. Data – 21.05.2024.
11. **Wyróżnienie** – Zajęcie I miejsca w sesji komunikatowej za wystąpienie pt. „Zdolność wytwarzania amin biogennych przez szczepy Enterococcus ssp. pochodzące z żywności". Konferencja – II Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Żywność i żywienie w pigułce" (ogólnopolska). Forma – prezentacja; samodzielność – indywidualnie. Rok – 2023.
12. **Nagroda** – Laureat nagrody firmy ECOLAB dla najlepszego absolwenta Wydziału Nauki o Żywności UWM w Olsztynie (członek Studenckich Kół Naukowych). Rok – 2020.
13. **Nagroda** – Finalista nagrody firmy Tetra Pak dla najlepszego absolwenta Wydziału Nauki o Żywności UWM w Olsztynie. Rok – 2020.
14. **Nagroda** – Zajęcie I miejsca w finale (III stopień) XLI Olimpiady Wiedzy o Mleku i Mleczarstwie, Łomża. Rok – 2015.

Stypendia i nagrody (stypendia, wyróżnienia uczelniane i fundacyjne)

1. **Laureat stypendium** I edycji programu Impact'26 dla młodych naukowców 2026 – 1 z 30 naukowców w Polsce.
2. **Stypendium/Nagroda** – Laureat Nagrody Santander dla studentów i doktorantów Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Rok – 2025.
3. **Stypendium/Nagroda** – Laureat Nagrody Santander dla studentów i doktorantów Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Rok – 2024.

4. **Stypendium** – Stypendysta Fundacji KOPIPOL – Fundusz Wsparcia Twórców. Rok – 2024.
5. **Stypendium** – Stypendium Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie dla najlepszych studentów (rok akademicki 2019/2020). Rok przyznania – 2019.
6. **Stypendium** – Stypendium Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie dla najlepszych studentów (rok akademicki 2018/2019). Rok przyznania – 2018.
7. **Stypendium** – Stypendium Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie dla najlepszych studentów (rok akademicki 2017/2018). Rok przyznania – 2017.

Odbyte warsztaty i szkolenia naukowe

1. Szkolenie – Obsługa i konserwacja Termocyklera QuantStudio 5. Organizator – Argenta. Rok – 2025.
2. Szkolenie – Decontamination and sterilization of medical devices. Organizator – Health Emergencies Programme, World Health Organization. Rok – 2025.
3. Szkolenie/konferencja – „Stare i nowe patogeny – aktualne problemy". Organizator – IX Ogólnopolska Konferencja Naukowo-Szkoleniowa, Uniwersytet Medyczny w Lublinie. Rok – 2024.
4. Zebranie naukowo-szkoleniowe – Polskie Towarzystwo Mikrobiologów Oddział w Olsztynie & Argenta. Rok – 2023.
5. Szkolenie – „Ogólnopolska Konferencja – Rewolucja żywnościowa w Europie – 2024–2025" (Bezpieczeństwo żywności w praktyce; zmiany w prawie żywnościowym). Organizator – educado. Rok – 2023.
6. Szkolenie – „XI Konferencja Online – Ogólnopolskie Spotkania Mikrobiologów i Epidemiologów". Rok – 2023.
7. Szkolenie – „Technika LC-MS/MS we współczesnej analizie próbek biologicznych i żywności". Organizator – Merck Sp. z o.o. Rok – 2023.
8. Szkolenie – „Wykorzystanie cytometrii przepływowej w badaniach mikrobiologicznych". Organizator – Merck Sp. z o.o. Rok – 2023.
9. Szkolenie – „Monitoring środowiska produkcyjnego żywności". Organizator – Argenta. Rok – 2023.
10. Kurs/Szkolenie – „Whole genome sequencing of bacterial genomes – tools and applications" (bioinformatyka). Organizator – Technical University of Denmark / Coursera. Rok – 2023.

11. Szkolenie – „Jak szybko i skutecznie ocenić stan higieniczny powierzchni produkcyjnych w przemyśle spożywczym”. Organizator – Merck Sp. z o.o. Rok – 2022.
12. Szkolenie – „Szkło borokrzemianowe w laboratorium – najwyższa klasa”. Organizator – Merck Sp. z o.o. Rok – 2022.
13. Szkolenie – „Optymalizacja PCR”. Organizator – Merck Sp. z o.o. Rok – 2022.
14. Szkolenie – „Analiza kannabinoidów w próbkach żywnościowych”. Organizator – Merck Sp. z o.o. Rok – 2022.
15. Szkolenie – „Wykorzystanie chromatografii cienkowarstwowej do szybkiej analizy jakościowej”. Organizator – Merck Sp. z o.o. Rok – 2022.
16. Szkolenie – „Oczyszczanie i wykrywanie białek rekombinowanych”. Organizator – Merck Sp. z o.o. Rok – 2022.
17. Szkolenie – „Excel 365 – Praca z tabelami i wykresami przestawnymi”. Platforma – Udemy. Rok – 2021.
18. Szkolenie – „Wzorce, materiały odniesienia i certyfikowane materiały odniesienia – definicje, charakterystyka i metody certyfikacji”. Organizator – Merck Sp. z o.o. Rok – 2021.
19. Szkolenie – „Chromatografia gazowa – omówienie techniki, dobór kolumny chromatograficznej, wskazówki praktyczne”. Organizator – Merck Sp. z o.o. Rok – 2021.
20. Szkolenie – „Nowoczesne urządzenia wspomagające pracę z hodowlami komórkowymi”. Organizator – Merck Sp. z o.o. Rok – 2021.
21. Szkolenie – „Oznaczanie mykotoksyn i alergenów w żywności techniką ELISA”. Organizator – Argenta. Rok – 2021.
22. Szkolenie – „Smart up your lab – rozwiązania ułatwiające pracę i poprawiające bezpieczeństwo w laboratoriach chemicznych”. Organizator – Merck Sp. z o.o. Rok – 2021.
23. Szkolenie – „Zastosowanie nowatorskich metod cytometrycznych w wieloparametrycznej analizie”. Organizator – Merck Sp. z o.o. Rok – 2021.
24. Szkolenie – „Ilościowa ocena lekowrażliwości drobnoustrojów oraz wykrywanie mechanizmów oporności z zastosowaniem systemu BacterOMIC™”. Rok – 2021.
25. Szkolenie – Obsługa autoklawów (warunki BHP). Rok – 2020.
26. Szkolenie – „Postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora”, eDoktorant 2.0. Rok – 2021.
27. Kurs – „Warsztaty z oprogramowania do projektowania bryłowego SOLIDWORKS®”. Rok – 2019.

Wyjazdy badawcze i staże naukowe

1. **Fundación Centro Tecnolóxico da Carne Ourense**, Ourense/Hiszpania – staż zagraniczny (03.11.2025 – 15.11.2025), opiekun stażu: PhD Jose Mannuel Lorenzo.
2. **Ege University**, Department of Food Engineering, Bornova/İzmir, Turcja – wyjazd badawczy (07.08.2025–21.08.2025), opiekun wyjazdu: Assoc. Prof. Burcu ÖZTÜRK KERİMOĞLU.
3. **University of Bologna**, Food Microbiology Laboratory, Department of Agricultural and Food Science (DISTAL), Cesena, Włochy – staż zagraniczny (luty–marzec 2023), opiekun stażu: PhD Giulia TABANELLI.
4. **Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN**, Olsztyn – staż krajowy (luty–marzec 2020), opiekun stażu: dr hab. Bartosz FOTSCHKI.

Wykłady na zaproszenie

1. Seminarium na zaproszenie (2025), Polskie Towarzystwo Technologów Żywności Oddział w Olsztynie. Temat wykładu: *High-Pressure Processing Influens Antibiotic Resistance Genes Transfer in Listeria monocytogenes isolated form Food and Processing environment.*
2. Wykład na zaproszenie (07.05.2025 r.), Firma Argenta oraz Polskie Towarzystwo Mikrobiologów Oddział w Olsztynie – zdalne posiedzenie naukowo-szkoleniowe. Temat wykładu: *Wysokie ciśnienie, wysokie ryzyko? Transfer genów oporności na antybiotyki u Listeria monocytogenes pod wpływem technologii wysokich ciśnień.*

Członkostwo w kołach naukowych, stowarzyszeniach i zespołach

1. 2026 – obecnie – członek **Wydziałowej Komisji ds. Infrastruktury,** Wydziału Nauki o Żywności, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
2. 2026 – obecnie – członek **Zespołu ds. Promocji Wydziału Nauki o Żywności** Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
3. 2025 – obecnie – członek **American Dairy Science Association**
4. 2023 – obecnie – członek **Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów**
    - 2025 – obecnie – członek Komisji Rewizyjnej Oddział w Olsztynie
5. 2022 – obecnie – członek **Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności**
6. 2017 – obecnie – członek **Naukowego Koła Mikrobiologii Żywności „Kocuria”**

    - 2023 – obecnie – **Przewodniczący Koła**
7. 2015 – 2020 – członek **Studenckiego Koła Naukowego Higieny Żywności i Toksykologii**
    - 2016 – 2020 – **Przewodniczący Koła**

Wykonanie recenzji naukowych – łącznie 31 recenzji

1. *Acta Alimentaria, An International Journal of Food Science* (AKJournals) [1]
2. *Antibiotic* (Multidisciplinary Digital Publishing Institute) [1]
3. *Applied Food Research* (Elsevier) [1]
4. *Archives of Microbiology* (Springer Nature) [1]
5. *Biologia* (Springer Nature) [1]
6. *Biomolecules* (Multidisciplinary Digital Publishing Institute) [1]
7. *BMC Microbiology* (Springer Nature) [2]
8. *Coatings* (Multidisciplinary Digital Publishing Institute) [1]
9. *Discover Food* (Springer Nature) [1]
10. *Environments* (Multidisciplinary Digital Publishing Institute) [1]
11. *Food and Bioprocess Technology* (Springer Nature) [5]
12. *Foods* (Multidisciplinary Digital Publishing Institute) [6]
13. *Journal of Medical Internet Research* (JMIR Publications) [3]
14. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* [1]
15. *Microbiology Research* (Multidisciplinary Digital Publishing Institute) [1]
16. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* (Springer Nature) [1]
17. *Toxins* (Multidisciplinary Digital Publishing Institute) [1]
18. *Trends in Food Science & Technology* (Elsevier) [1]
19. *Veterinary Medicine and Science* (Wiley) [1]

Publikacje naukowe

Całkowita liczba publikacji	**22**
Publikacje stanowiące rozprawę doktorską	5
Rozdziały w monografiach pokonferencyjnych	19

Autorstwo/współautorstwo w pracach naukowych

Lp.	Rok	Czasopismo	Punkty MNiSW/MEiN	IF
1.	2026	Foods*	100	5.1
2.	2025	Food Microbiology*	140	4.6
3.	2025	International Journal of Molecular Sciences*	140	4.9
4.	2025	International Journal of Molecular Sciences	140	4.9
5.	2025	Journal of Dairy Science*	200	4.4
6.	2025	Journal of Dairy Science	200	4.4
7.	2025	NFS Journal	140	3.3
8.	2025	Gospodarka Mięsna*	20	-
9.	2025	Gospodarka Mięsna	20	-
10.	2024	Pathogens*	100	3.3
11.	2024	Applied Science*	100	2.5
12.	2024	International Journal of Molecular Sciences*	140	4.9
13.	2024	Food Microbiology*	140	4.6
14.	2024	Foods*	140	5.1
15.	2024	Toxins*	140	4.0
16.	2023	Foods*	140	5.1
17.	2023	Przegląd mleczarski*	40	-
18.	2022	NFS Journal	140	3.3
19.	2022	Pathogens*	100	3.3
20.	2020	Pathogens	100	3.3
21.	2020	Przemysł Spożywczy*	20	-
22.	2020	Przegląd Mleczarski*	5	-
Rozdziały w monografiach pokonferencyjnych			485	-
SUMA			**2890**	**71**

[1] Liczba punktów zgodnie z załącznikami do komunikatów MNiSZW oraz wykazem MEiN zgodna z rokiem opublikowania pracy

[2] Impact Factor (IF) według listy *Journal Citation Reports* (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania pracy, dla prac, których IF nie został obliczony liczono ostatni aktualny

* funkcja autora korespondencyjnego

Inne aktywności naukowe

Doniesienia na konferencjach naukowych	38
Prelegent	24
Współautor wystąpienia	14
Wyjazdy badawcze/staże naukowe	4
Udział w kołach i towarzystwach naukowych	7
Udział w projektach badawczych	8
Wykonane recenzje artykułów	31

Wskaźnik oceny dorobku naukowego (Web of Science)

H-index	8
Liczba cytowań (bez autocytowań)	153

Wskaźnik oceny dorobku naukowego (Web of Science)

H-index	8
Liczba cytowań (bez autocytowań)	153

ZAŁĄCZNIKI

Pełne teksty publikacji naukowych wchodzące w skład niniejszej rozprawy wraz z oświadczeniami współautorów.

Lista załączników:

1. **Załącznik nr 1.** Pełen tekst publikacji **P1** wraz z oświadczeniami współautorów.
2. **Załącznik nr 2.** Pełen tekst publikacji **P2** wraz z oświadczeniami współautorów.
3. **Załącznik nr 3.** Pełen tekst publikacji **P3** wraz z oświadczeniami współautorów.
4. **Załącznik nr 4.** Pełen tekst publikacji **P4** wraz z oświadczeniami współautorów.
5. **Załącznik nr 5.** Pełen tekst publikacji **P5** wraz z oświadczeniami współautorów.

Załącznik nr 1

Publikacja P1

Wiśniewski, P., Zakrzewski, A. J., Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W. (2022). Antimicrobial Resistance and Virulence Characterization of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Food and Food Processing Environments. *Pathogens*, 11, 1099. https://doi.org/10.3390/pathogens11101099.

MNiSW – 100; IF – 3.7; WoS – 48; GS – 63; RG – 58

pathogens

MDPI

Article

Antimicrobial Resistance and Virulence Characterization of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Food and Food Processing Environments

Patryk Wiśniewski *, Arkadiusz Józef Zakrzewski, Anna Zadernowska and Wioleta Chajęcka-Wierzchowska

Department of Industrial and Food Microbiology, University of Warmia and Mazury, Plac Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn, Poland

* Correspondence: patryk.wisniewski@uwm.edu.pl

Abstract: *Listeria monocytogenes* is a particularly foodborne pathogen associated with listeriosis, which can be disseminated in food and food processing environments. This study aimed to determine the serotypes and characteristics of virulence factors and antibiotic resistance among 40 *L. monocytogenes* strains isolated from food (n = 27) purchased in Olsztyn (Warmia and Mazury region, Poland) and food processing environments in Poland (n = 13). Isolates were assigned to serotypes 1/2a, 1/2c, 3a, and 3c using polymerase chain reaction (PCR). The results showed that serotype 1/2a (66.7%) was the most prevalent among strains from food, and serotype 1/2c (53.8%) among strains from the food processing environments. Five different virulence factors (*hlyA, prfA, inlB, luxS, sigB*) were detected in all isolates from the food processing environments using PCR. The *hlyA* (100.0%), *prfA* (100.0%), and *inlB* (96.3%) were the most prevalent in food strains. Seven (25.9%) of the strains of food and ten (76.9%) strains from the food processing environments showed the ability to form biofilm. The tested isolates were subjected to antibiotic susceptibility testing against 12 antibiotics used in the mitigation of listeriosis, using the disk diffusion method. The most frequent were intermediate resistance and resistance to clindamycin. Twelve (92.3%) strains from the food processing environments, and twenty-three (85.2%) from food were non-susceptible to clindamycin. Generally, antibacterial resistance determinants (*Lde*, *aadB*, *aac(3)-IIa(aacC2)*^{a}, *penA*, *mefA*, *lnuA*, *lnuB*, *sulI, sulII*) were detected in sixteen (59.0%) strains from food and four (30.8%) from the food processing environments, by PCR. The most frequent were the *mefA-lnuA* (n = 7; 20.0%) and *lnuA* (n = 6; 17.1%) genotypes. From this research, we can conclude that virulent and antimicrobial-resistant strains of *L. monocytogenes* are present in food and the food processing environment in Poland, which may pose a potential health risk to consumers. Monitoring for the control of virulent and antimicrobial-resistant *L. monocytogenes* strains in the food system can contribute to effective planning and prevention of their spread.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; virulence factors; virulence genes; antimicrobial resistance; resistance genes; food; food processing environments

check for updates

Citation: Wiśniewski, P.; Zakrzewski, A.J.; Zadernowska, A.; Chajęcka-Wierzchowska, W. Antimicrobial Resistance and Virulence Characterization of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Food and Food Processing Environments. *Pathogens* **2022**, *11*, 1099. https://doi.org/10.3390/pathogens11101099

Academic Editors: Kidon Sung, Saeed Khan and Juhee Ahn

Received: 26 August 2022
Accepted: 23 September 2022
Published: 25 September 2022

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

Copyright: © 2022 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

Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen isolated from food and food processing environments due to its ability to proliferate over a vast range of adverse environmental conditions encompassing low temperature, low pH, high pressure, and high salt concentration [1]. Listeriosis is characterized by high morbidity and mortality, especially in people from risk groups (including the elderly, pregnant women, newborns, and people with weakened immune systems) [2]. In 2019, listeriosis had the highest rate of hospitalised cases and the highest number of deaths of all zoonoses under EU surveillance [3,4].

The species *L. monocytogenes* is classified into four main evolutionary lineages, and thirteen different serotypes of which three serotypes (1/2a, 1/2b and 4b) are responsible

for 95% of human listeriosis cases [5]. The ability of this organism to invade host cells depends on many virulence factors, including the presence of genes that are usually located in clusters located throughout the chromosome (including several listerial pathogenicity islands (LIPI-1to LIPI-4) [5,6]. Several virulence genes are located on LIPI-1 (especially *prfA* and *hly*), which are used to assess the virulence potential of isolates [7]. The majority of *L. monocytogenes* isolates belong to Lineages I and II, including serotypes 1/2a, 1/2b, 1/2c, and 4b, which are mostly present in food, natural, and agricultural environments, but have also been isolated from cases of listeriosis in animals and humans. However outbreaks of listeriosis in humans are mostly associated with Lineage I isolates [8].

Due to its virulence and ease of spread in the environment, *L. monocytogenes* remains a serious threat to food safety [1]. Undoubtedly, environmental stress during food production has a significant impact on pathogenicity, gene expression, and changes in antimicrobial resistance. Exposure to sub-lethal concentrations of antimicrobials results in adaptation to higher concentrations of antimicrobials, which may consequently result in cross-resistance to antibiotics [9]. *L. monocytogenes* strains are naturally resistant to cefotaxime, cefepime, fosfomycin, oxacillin, and lincosamides [10,11]. According to other studies, *L. monocytogenes* is at most susceptible to a wide range of antibiotics, which have bactericidal effects against gram-positive bacteria [12]. Unfortunately, recently resistant strains have been observed more frequently among food and environment isolates [9]. Due to adaptive mechanisms, including the exchange of antimicrobial resistance determinants with other bacterial species through horizontal gene transfer, biofilm-forming ability, and efflux pumps, *L. monocytogenes* strains can acquire resistance to the antimicrobials used, resulting in their ineffectiveness [9].

As antimicrobial resistance among microorganisms is growing at an exponential rate and resistance to commonly used antibiotics is spreading among pathogens, it is necessary to better understand the antibiotic resistance and virulence among the strains with various phenotypic and genetic backgrounds, and isolated from various locations in different countries and globally, for further effective mitigation. Therefore, the study aimed to determine the serotypes, the frequency of virulence factors such as the ability to biofilm formation, slime production, and virulence-related genes among *L. monocytogenes* strains isolated from the food and food processing environments in Poland. Moreover, the antimicrobial resistance profile and genes associated with antimicrobial resistance were also examined.

2. Materials and Methods

2.1. Strains

Isolates were obtained from the microbiological collection of the Department of Industrial and Food Microbiology of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn, previously isolated during the pilot study (Supplementary Table S1). All isolates were stored in Microbank^{TM} (Biomaxima, Lublin, Poland) at −80 °C. All stored strains were resuscitated by streaking the beads on TSA (Tryptone Soya Agar; Merck, Darmstadt, Germany) and incubation at 37 °C for 24 h. Forty *L. monocytogenes* strains (twenty-seven food strains obtained from foods products purchased in Olsztyn (Warmia and Mazury region Poland) from 2020–2021 and thirteen from the food processing environments obtained from Polish food processing companies from 2020–2021) were used in the current study. Each of the isolates was previously identified phenotypically on ALOA agar (Agar Listeria Ottaviani and Agosti, Merck, Germany). Additionally, all of the strains were confirmed using two methods—the MALDI-TOF MS method (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry) according to the previously described paper [13], and the genotypic method (polymerase chain reaction (PCR))–described previously by Ryu et al. [14] (Table S3). PCRs were performed using 2 µL of template DNA, 0.2 µL of *prs* (100 pmol), 0.56 µL of *lmo1030* (100 pmol), 2.5 µL of 10 × DreamTaq PCR Buffer including $MgCl_2$ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0.25 µL of dNTP and 1 U of Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in a total reaction volume

of 25 µL. The primer sequences, PCR cycling condition and product sizes are shown in Table S3.

2.2. Serotyping

Total DNA was extracted according to the instruction manuals of the Genomic Mini DNA extraction kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland). The multiplex PCR technique previously described by Nho et al. (2015) [15] was used for the classification of *L. monocytogenes* strains to different serotypes from Lineage I—most prevalent among food and food-related sources. PCRs were performed using 2 µL of template DNA, 0.4 µL of *flaA* (100 pmol), 0.2 µL of *LMOSLCC2372_0308* (100 pmol) and *LMLG_0742* (100 pmol) and 5 µL of 2 × DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in a total reaction volume of 25 µL. The primer sequences, PCR cycling condition and product sizes are shown in Table S3.

2.3. In Vitro Biofilm Production Analysis

2.3.1. Detection of the Ability to Slime Production with Congo Red Agar (CRA) Method

The ability to produce slime was determined using the Congo Red Agar method [16]. Plates were streaked with fresh, 24 h culture on CRA and incubated at 37 °C for 24 h. After incubation, the plates were stored at room temperature (23 °C) for 48 h. The ability to produce slime was interpreted according to the colony phenotype. Black colonies were recorded as positive results for slime production, and dark red and red colonies were recorded as negative results.

2.3.2. Biofilm Production Assay by the Microtiter Plate (MTP) Method

The ability to produce a biofilm was tested on 96-well, flat-bottomed, sterile polystyrene plates (Promed®) based on the techniques previously proposed by Stepanović et al. [17] with minor changes described previously [18]. The strength of biofilm formation was determined by measuring the absorbance at 570 nm using spectrophotometric microplate reader Varioscan LUX (Thermo Scientific, San José, CA, USA). Optical densities (ODs) for each test strain were determined from the arithmetic mean of 3 replicates by taking measurements at 20 locations in each well. The value obtained was compared with the OD cut-off value (ODc), which was defined as three standard deviations above the mean OD of the negative control. Negative control wells contained BHI broth (Merck, Darmstadt, Germany) only. A scale proposed by Stepanović et al., 2007 [17] was used to determine the strain's ability to form a biofilm—no biofilm production (OD $\leq$ ODc), weak biofilm production (ODc < OD $\leq$ 2xODc), moderate biofilm production (2xODc < OD $\leq$ 4xODc) and strong biofilm production (4xODc < OD).

2.4. The Presence of the Virulence-Associated Genes

All isolates were tested for the presence of five virulence-related genes. The presence of the virulence-associated genes was detected by the PCR technique, previously described by Zakrzewski et al. (2020) [19]. The PCRs were performed using 2 µL of template DNA, 2 µL of each primer (100 pmol), and 12.5 µL of 2 × DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in a total reaction volume of 25 µL. The primer sequences, PCR cycling conditions, and product sizes of virulence-associated genes are shown in Table S3.

2.5. Phenotypic Antibiotic-Resistance Analysis

Antibiotic Susceptibility Testing and Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Determination

Antimicrobial susceptibility was determined using the Kirby–Bauer disc diffusion method according to the standard procedure described by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [20] and the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [21]. Twelve antibiotics commonly used in the treatment of

clinical infection or agricultural procedures were tested. Twelve tested antibiotics (Oxoid, United Kingdom) were selected among ten classes of antimicrobials: aminoglycosides: gentamicin (10 µg); beta-lactams: ampicillin (AMP—10 µg), penicillin G (P—1 U); carbapenems: meropenem (MEM—10 µg); fluoroquinolone: ciprofloxacin (CIP—5 µg); lincosamides: clindamycin (DA—2 µg); macrolides: erythromycin (E—15 µg), vancomycin (VA—30 µg); phenicols: chloramphenicol (C—30 µg); rifampicins: rifampicin (RD—5 µg); sulphonamides: trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT—25 µg); tetracycline: tetracycline (TE—30 µg).

McFarland (0.5) standard concentration suspensions in sterile saline (0.9%) were prepared from overnight bacterial colonies on TSA (Merck, Germany). A sterile swab was used to inoculate the suspension evenly on Mueller-Hinton agar (Merck, Darmstadt, Germany), and antibiotics discs were transferred on the agar using a disc dispenser, after which they were incubated for 24 h at 37 °C. After incubation, the inhibition zones were measured and interpreted as "Resistant (R), Intermediate (I), or Susceptible (S)" using standard reference values according to EUCAST for *L. monocytogenes* [21]. Additionally, due to the lack of standards for antibiotics not included in EUCAST for *L. monocytogenes,* the standards for Staphylococci were used.

Strains that were identified as resistant to antibiotics by the Kirby–Bauer diffusion method (Resistant (R), Intermediate (I)) were tested for Minimal Inhibitory Concentration (MIC) using MTS™ (MIC Test Strips) (Liofilchem®, Roseto degli Abruzzi, TE, Italy) following the manufacturer's instructions. This study included five different antibiotics: ciprofloxacin, gentamicin, clindamycin, penicillin G, and SXT (trimethoprim-sulfamethoxazole).

2.6. Detection of Antimicrobial Resistance Genes

The isolates showing resistance and intermediate resistance obtained from phenotypic analyses were selected for antimicrobial resistance genes detection analyses. Isolates showing susceptibility in phenotypic analysis were not selected for further analyses.

Antimicrobial resistance genes were screened using PCR techniques. Eight antimicrobial resistance genes were tested, including genes encoding resistance to ciprofloxacin (*Lde*), gentamicin (*aadB, aac(3)-IIa(aacC2)*[a]), penicillin G (*penA*), clindamycin (*lnuA, lnuB, mefA*), and trimethropim/sulfametaxazole (*sulI, sulII*). Primer sequences, concentration, PCR cycling condition, and product sizes of antimicrobial resistance genes are shown in Supplementary Table S2.

2.7. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using STATISTICA 13.3 StatSoft® software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) using the Chi-squared test. For the analyses, $p \leq 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Presence of Serotypes and Virulence Factors of L. monocytogenes Isolates

Isolates were assigned to serotypes 1/2a, 1/2c, 3a, and 3c. Serotype 1/2a (66.7%) was the most prevalent among strains from food samples, and serotype 1/2c (53.8%) among strains from the food processing environments. Three strains isolated from food were not assigned to lineage I strains. Five virulence determinants were also characterized in the study. The genes belonging to LIPI-1, *prfA,* and *hlyA* were detected in all isolates. The *inlB* gene was the most prevalent in food isolates. In isolates from the food processing environments, *inlB, luxS, and sigB* genes were detected in all isolates. The results showed that only two of the food isolates and one strain from the food processing environments showed a strong ability to form biofilm in the microtiter plate (MTP) method. Four strains from both the food and food processing environments showed a moderate ability for biofilm production. One isolate from food and five isolates from the food processing environments showed a weak ability to produce biofilm. The statistical analysis showed that the isolation

source of *L. monocytogenes* has a significant effect on the isolated serotype ($p = 0.0009$) and ability to produce biofilm ($p = 0.0022$). No statistically significant differences were found between the source of isolation and the ability to produce slime ($p = 0.1435$) and resistance to antimicrobial agents ($p = 0.6972$).

Evaluation of the ability of slime production using the CRA method showed that only four strains from food are slime producers. None of the food processing environment strains showed the ability to produce slime. The virulence characteristics of the tested strains are presented in Table 1. The results for individual isolates and various tests in this study were provided together in the Supplementary Table S1.

Table 1. Occurrence, serotypes, phenotypic, and genotypic determinants of *L. monocytogenes* virulence recovered from food and food processing environments.

Sample Type			**Food**	**Food Processing Environments**
No. of *L. monocytogenes* Strains			27 (67.5)	13 (32.5)
Serotypes (%)		**1/2a**	18 (66.7)	2 (15.4)
		1/2c	2 (7.4)	7 (53.8)
		3a	0 (0.0)	2 (15.4)
		3c	4 (14.8)	2 (15.4)
		Other	3 (11.1)	0 (0.0)
Genetic determinants of virulence (%)	**LIPI-1**	***hlyA***	27 (100.0)	13 (100.0)
		prfA	27 (100.0)	13 (100.0)
	Biofilm	***inlB***	26 (96.3)	13 (100.0)
		luxS	20 (74.1)	13 (100.0)
		sigB	20 (74.1)	13 (100.0)
Biofilm formation (%)		**Weak**	1 (3.7)	5 (38.5)
		Moderate	4 (14.8)	4 (30.8)
		Strong	2 (7.4)	1 (7.6)
		Negative	20 (74.1)	3 (23.1)
Slime production (%)		**Positive**	4 (14.8)	0 (0.0)
		Negative	23 (85.2)	13 (100.0)

3.2. Antimicrobial Susceptibility Testing and Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Determination

In total, 37 isolates (92.5%) were resistant or intermediately resistant to one or more antibiotics. All strains were sensitive to the following antibiotics: ampicillin, chloramphenicol, erythromycin, rifampicin, tetracycline, and vancomycin. A high frequency of resistance (R) and intermediate resistance (I) to clindamycin among the strains were observed. Some of the strains from food also showed resistance to meropenem and trimethoprim/sulfamethoxazole. In addition, strains from food processing environments showed resistance to penicillin G and trimethoprim/sulfamethoxazole. Additionally, strains from food also revealed intermediate resistance to ciprofloxacin and gentamicin. The analyses were performed against 12 antibiotics, and for each analysis, *L. monocytogenes* strain is summarised in Table 2.

Table 2. Antibiotic resistance of *L. monocytogenes* strains isolated from food and food processing environments.

No.	Antibiotic	Resistance	Food		Food Processing Environments		Total
			Test Method Used				
			Disc Diffusion (%)	MIC Range (μg/mL)	Disc Diffusion (%)	MIC Range (μg/mL)	
1.	AMP	S	27 (100.0)	ND	13 (100.0)	ND	40 (100.0)
		I	0	ND	0	ND	0
		R	0		0		0
2.	C	S	27 (100.0)	ND	13 (100.0)	ND	40 (100.0)
		I	0	ND	0	ND	0
		R	0		0		0
3.	CIP	S	25 (92.6)	ND	13 (100.0)	ND	38 (95.0)
		I	2 (7.4)	0.38–0.50	0	ND	2 (5.0)
		R	0		0		0
4.	E	S	27 (100.0)	ND	13 (100.0)	ND	40 (100.0)
		I	0	ND	0	ND	0
		R	0		0		0
5.	CN	S	26 (96.3)	ND	13 (100.0)	ND	39 (97.5)
		I	1 (3.7)	0.19	0	ND	1 (2.5)
		R	0		0		0
6.	DA	S	4 (14.8)	ND	1 (7.7)	ND	5 (12.5)
		I	14 (51.9)	1.0–32.0	9 (69.2)	1.5–4.0	23 (57.5)
		R	9 (33.3)		3 (23.1)		12 (30.0)
7.	MEM	S	26 (96.3)	ND	13 (100.0)	ND	39 (97.5)
		R	1 (3.7)	0.047	0		1 (2.5)
8.	P	S	27 (100.0)	ND	12 (92.3)	ND	39 (97.5)
		R	0		1 (7.7)	1	1 (2.5)
9.	RD	S	27 (100.0)	ND	13 (100.0)	ND	40 (100.0)
		I	0		0		0
		R	0		0		0
10.	SXT	S	25 (92.6)	ND	10 (76.9)	ND	35 (87.5)
		R	2 (7.4)	0.064	3 (23.1)	0.064–0.125	5 (12.5)
11.	TE	S	27 (100.0)	ND	13 (100.0)	ND	40 (100.0)
		I	0		0		0
		R	0		0		0
12.	VA	S	27 (100.0)	ND	13 (100.0)	ND	40 (100.0)
		I	0		0		0
		R	0		0		0

MIC—minimum inhibitory concentration by using MTSTM (MIC Test Strips); ND—Not detected. S—Susceptible, I—Intermediate, R—Resistance; AMP—Ampicillin, C—Chloramphenicol, CIP—Ciprofloxacin, E—Erythromycin, CN—Gentamicin, DA—Clindamycin, MEM—Meropenem, P—Penicillin G, RD—Rifampicin, SXT—Trimethoprim/Sulfamethoxazole, TE—Tetracycline, VA—Vancomycin.

The isolates showed seven different antibiotic resistance patterns (Table 3). The most observed pattern was resistance and intermediate resistance to clindamycin. A total of 20 isolates (74.0%) from foods and ten isolates (77.0%) from the food processing environments were resistant or intermediately resistant to only one antimicrobial agent. Only one isolate (3.7%) from food showed a multiresistance pattern.

Table 3. Antimicrobial resistance profiles of *L. monocytogenes* strains by serotype.

		Food					Food Processing Environments				
		Number (%) of Resistant Strains (n = 27)					Number (%) of Resistant Strains (n = 13)				
		1/2a	**1/2c**	**3c**	**Other**	**Total**	**1/2a**	**1/2c**	**3a**	**3c**	**Total**
1.	**DA (R/I)**	13 (48.1)	1 (3.7)	3 (11.1)	3 (11.1)	20 (74.0)	2 (15.4)	4 (30.8)	2 (15.4)	2 (15.4)	10 (77.0)
3.	**CN (I), SXT (R)**	1 (3.7)	-	-	-	1 (3.7)	-	-	-	-	-
4.	**DA (I), CIP (I)**	1 (3.7)	-	1 (3.7)	-	2 (7.4)	-	-	-	-	-
5.	**DA (I), SXT (R)**	-	-	-	-	-	-	2 (15.4)	-	-	2 (15.4)
6.	**P (R), SXT (R)**	-	-	-	-	-	-	1 (7.7)	-	-	1 (7.7)
7.	**DA (R), MEM (R), SXT (R)**	1 (3.7)	-	-	-	1 (3.7)	-	-	-	-	-
	Not resistance for all	2 (7.4)	1 (3.7)	-	-	3 (11.1)	-	-	-	-	-

S—Susceptible, I—Intermediate, R—Resistance; CIP—Ciprofloxacin, CN—Gentamicin, DA—Clindamycin, MEM—Meropenem, P—Penicillin G, SXT—Trimethoprim/Sulfamethoxazole.

3.3. Antimicrobial Resistance Gene Profiling

Isolates showing phenotypic antimicrobial resistance (R or I) were tested for the presence of the gene encoding this resistance. Ciprofloxacin resistance gene *Lde* and gentamicin resistance gene *aadB* were detected in all strains showing phenotypic resistance. Sulphonamide resistance gene *sulI* was detected in four (80.0%) of five isolates, whereas the *sulII* gene was detected in only two strains (40.0%). Clindamycin resistance genes were detected in 15 (42.9%) of 35 strains. The *lnuA* gene was most prevalent among the strains (n = 13, 37.2%) compared with the *mefA* gene (n = 9, 25.8%). The *lnuB*, *penA,* and *aac(3)-IIa(aacC2)*[a] genes were not detected in any of the isolates (Table 4). The strains showed three different resistance genotypic patterns for clindamycin (Table 5). Generally, tested resistance determinants were detected in 15 (55.6%) strains from food and four (30.8%) strains from the food processing environments. A total of eight resistant isolates (50.0%) from foods and two resistant isolates (40.0%) from the food processing environments had only one tested resistance gene.

Table 4. The occurrence of resistance genes of *L. monocytogenes* strains isolated from the food and food processing environments.

Antibiotic (n)	Antibiotic Resistance Genes	Isolates from Food	Isolates from the Food Processing Environments	Total Positive
CIP (2)	*Lde*	2 (100.0)	-	2 (100.0)
CN (1)	*aadB*	1 (100.0)	-	1 (100.0)
	aac(3)-IIa(aacC2)[a]	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
P (1)	*penA*	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
DA (35)	*mefA*	8 (22.9)	1 (2.9)	9 (25.8)
	lnuA	12 (34.3)	1 (2.9)	13 (37.2)
	lnuB	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
SXT (5)	*sulI*	1 (20.0)	3 (60.0)	4 (80.0)
	sulII	1 (20.0)	1 (20.0)	2 (40.0)

CIP—Ciprofloxacin, CN—Gentamicin, P—Penicillin G, DA—Clindamycin, SXT—Trimethoprim/Sulfamethoxazole. "a" is a continuation of the gene name

Table 5. Genotypic resistance patters between *L. monocytogenes* strains by serotype for clindamycin.

		Food					Food Processing Environments					Total Number (%) of Clindamycin Resistant Strains (n = 35)
		Number (%) of Clindamycin Resistant Strains (n = 23)					Number (%) of Clindamycin Resistant Strains (n = 12)					
		1/2a	1/2c	3c	Other	Total	1/2a	1/2c	3a	3c	Total	
1.	*lnuA*	4 (17.0)	-	-	1 (4.3)	5 (21.3)	-	1 (8.3)	-	-	1 (8.3)	6 (17.1)
2.	*mefA*	1 (4.3)	-	-	-	1 (4.3)	-	1 (8.3)	-	-	1 (8.3)	2 (5.7)
3.	*mefA-lnuA*	3 (12.7)	-	2 (8.4)	2 (8.4)	7 (30.4)	-	-	-	-	-	7 (20.0)

4. Discussion

Listeria monocytogenes is the main aetiology of listeriosis, a serious threat to human health [22]. In this study, all four serotypes that belong to Lineage I were observed. The most prevalent serotypes were serotypes 1/2a (66.7%) for food and 1/2c (53.8%) for the food processing environments. The results were consistent with previously published studies [23–28]. In food and the production environment, the dominant group is lineage I (1/2a, 1/2c, 3a, 3c) due to its potential ability to survive in many food matrices. Furthermore, serotypes belonging to lineage I are one of the causes of outbreaks of listeriosis in humans.

The pathogenicity of *L. monocytogenes* is affected by various virulence determinants whose presence may significantly contribute to an increase in the strains' virulence, and thus, cause infections in humans [29]. This study analysed five different factors that encode the strains' virulence. In each isolate, the presence of the LIPI-1 pathogenicity island was confirmed. The LIPI-1 island comprises six genes (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, and *plcB*), of which two, *prfA* and *hly*, are mainly identified as target genes in the assessment of the virulence potential of *L. monocytogenes* isolates in view of their possible transcription during the development of these pathogens in different types of food [7]. The PrfA transcription activator, encoded by *prfA*, is responsible for the transcription of more than 140 genes (including all the genes present in LIPI-1). Listeriolysin O (LLO), a toxin required for the bacterial escape from phagosomes is encoded by *hly*. The absence of LLO results in the strain's avirulence [30]. In the current study analysed the presence of two LIPI-1 genes, i.e., *prfA* and *hly*, which were identified in all the tested strains. These results are in line with those obtained in studies conducted by Sudagidan et al., 2021 [31] and Iwu and Okoh, 2020 [32], who demonstrated the presence of the *hlyA* gene in all strains (n = 32 and n = 20,

respectively), and in a study by Du et al., 2016 [33], who detected the *prfA* and *hlyA* genes in 100.0% of the tested strains (n = 21).

In addition to the LIPI-1 island genes, the present study also analysed three genes (*inlB*, *luxS*, *sigB*) that affect the biofilm formation ability. The analysed genes were detected in all the tested strains derived from the food processing environment, while in the strains derived from food, the *inlB* gene was detected in almost all the strains (*n* = 26; 96.3%), while the *luxS* and *sigB* genes were detected in 20 strains (74.1%). The presence of the *inlB* gene (internalin B encoding gene) is linked to the strain's ability to adhere to abiotic surfaces [34]. This gene was identified in all *L. monocytogenes* strains isolated from food as well as from the environment [6,31,35]. However, in certain studies, the prevalence is lower (*n* = 15; 71.4%) [33]. The *luxS* gene (which encodes the production of the autoinductor-2 (AI-2) molecules) is responsible for the interspecies communication and is also specifically involved in the ability of biofilm formation by *L. monocytogenes* [36]. The last of the analysed genes, i.e., *sigB* (responsible for encoding alternative sigma factor sigma B), is one of the two main transcription factors (except PrfA) affecting biofilm formation ability [37]. In the literature, the *luxS* genes are determined with a similar frequency of 71.4% (*n* = 5), while the *sigB* gene has a frequency of 100.0% (*n* = 7) [19]. The differences in the prevalence of individual genes may be due to mutations as well as to the source of isolation and origin of a particular strain [32]. The biofilm provides an ideal environment for growth and development and is one of the main concerns of the food industry [38]. The ability to form biofilm is a characteristic that facilitates *L. monocytogenes* survival of adverse environmental conditions in both food and the food production environment [39]. The strains derived from food processing environments were more frequently able to form a biofilm stronger than those generated by the strains isolated from food. The high prevalence of *L. monocytogenes* strains carrying the individual virulence genes obtained in the current study may indicate the high potential pathogenicity of the analysed strains and show that the isolates derived from food and production facilities may pose a real hazard to the public health [40]. The isolates derived from food processing environments are characterized by a greater number of various virulence factors than the strains derived from food due to their exposure to many sublethal stress factors such as osmotic stress, high hydrostatic pressure and acid stress prevailing in food production facilities, which improves their survivability and increases pathogenicity [32,41].

The published studies have reported the increasing of *L. monocytogenes* strains' resistance to the entire range of antibiotics of different classes [27,32,35,42–48]. The study analysed resistance to 12 antimicrobial agents, and demonstrated that the analysed *L. monocytogenes* strains were susceptible to a considerable proportion of the analysed agents except clindamycin, meropenem, penicillin G, and trimethoprim/sulfamethoxazole. Low resistance to meropenem (*n* = 1; 2.5%) and trimethoprim/sulfamethoxazole (*n* = 5; 12.5%) is in line with the results obtained previously by Şanlıbaba et al., 2018 [49] (resistance to meropenem in one strain (5.9%) and to trimethoprim/sulfamethoxazole in three isolates (17.7%)), and by Aksoy et al., 2018 [50] (resistance to meropenem in one strain (6.7%), and to trimethoprim/sulfamethoxazole in four (26.7%)). The resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole is related to the presence of the genes *sulI* and *sulII* [51]. The *sulI* gene was detected in four (80.0%) out of five strains that exhibited resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole, while the *sulII* gene was detected in two (40.0%) of the strains. Both genes were determined in one of the isolates derived from the food processing environment. As regards the resistance to penicillin G, resistance was noted in only one (2.5%) of the tested isolates. The results in the current study are in line with the observations of Noll et al., 2018 [52], who noted three (1.2%) strains resistant to penicillin G, and of Li et al., 2016 [53], who determined one (1.3%) resistant strain. In the current study, the phenotypic profile of *L. monocytogenes* resistance towards penicillin G was not confirmed through the detection of the *penA* gene. A study conducted by Babarandage et al., 2022 [54] also noted no presence of the *penA* gene in the isolates exhibiting phenotypic resistance to penicillin G.

Phenotypic antibiotic resistance testing indicated a particularly high level of resistance (n = 12; 30.0%) and intermediate resistance (n = 23; 57.5%) one of the antibiotics tested, i.e., clindamycin. Clindamycin is widely used in hospital and veterinary treatment in the event of infections caused by gram-positive bacteria [55]. Its mechanism of action is similar to that of erythromycin, i.e., it is responsible for the inhibition of protein synthesis due to the binding with the 50S subunit of bacterial ribosomes [49,56]. There are several studies indicating a high level of clindamycin resistance among the *L. monocytogenes* isolates derived from food and production facilities [45,53–61]. According to studies conducted by Şanlıbaba et al., 2018 [49] and Escolar et al., 2017 [56], the strains' resistance to clindamycin may be associated with the action of the clindamycin structure-modifying enzyme that contributes to the inactivation of the antibiotic action. The strains' resistance to clindamycin is often combined with sensitivity to erythromycin. In the current study, all strains exhibited sensitivity to this antibiotic of the macrolide class. This atypical combination, referred to as the L^R/M^S phenotype (lincosamide resistance and macrolide susceptibility phenotype), has been increasingly noted and may be associated with *lnuA* and *lnuB* genes [56,62]. In the current studies, the *lnuA* gene was detected in 13 strains (37.2%), while the presence of the *lnuB* gene was not found in any of them. In a study by Swetha et al., 2021 [27], the *lnuA* gene was identified in one (10.0%) of the strains isolated from food, while the *lnuB* gene was not detected in any of the isolates. These results are also in line with those obtained in a study by Escolar et el., 2017 [56], who analyzed seven *L. monocytogenes* strains isolated from ready-to-eat food. Each strain exhibited resistance to clindamycin while lacking the *lnuA* and *lnuB* genes. The current study also analyzed the presence of the macrolide resistance gene *mefA*. In contrast to the studies by Escolar et al., 2017 [56] and Granier et al., 2011 [63] (no isolates carrying the *mefA* gene), this gene was detected in nine (22.5%) isolates. Interestingly, seven of them also had the *lnuA* gene, and these strains exhibited intermediate resistance towards clindamycin. The strains isolated from food were characterized by a higher prevalence of the clindamycin resistance-encoding genes (n = 12; 56.0%) than the strains from the production environment (n = 2; 16.6%). It is presumed that the resistance in the strains having no clindamycin resistance-encoding genes may be associated specifically with the action of the clindamycin structure-modifying enzyme, whose activity may be induced by the effects of the sub-lethal environmental stress prevailing during food production. Further research is necessary to confirm this hypothesis.

5. Conclusions

The study provided data on the phenotypic and genotypic characteristics of serotypes, virulence, and antimicrobial resistance in *L. monocytogenes* isolates isolated from food and food production environments in Poland. This study indicated that the *L. monocytogenes* strains isolated from food purchased in Poland mainly belong to the 1/2a serotype, defined as one of the three serotypes with the highest pathogenic potential, which confirms the results of research on the occurrence of *L. monocytogenes* strains belonging to Lineage I in food and industry. Since the strains belonging to the 1/2a serotype may be more virulent than others, it is necessary to conduct additional research in order to assess their virulence. The isolates isolated from the food processing environment obtained from Polish plants were characterized by a higher frequency of biofilm formation, with the formed biofilms being stronger than those generated by the strains from food. The tested strains, in accordance with results on other strains isolated from food most frequently exhibited resistance to clindamycin. These results indicate resistance of the strains to antibiotics (penicillin G, gentamicin, ciprofloxacin, meropenem, trimethoprim/sulfamethoxazole) applicable to the clinical treatment of the disease. Likewise, the results obtained expand the knowledge of the pathogen's prevalence in the study region and point to an important public health problem that threatens the health of consumers. Therefore, the surveillance and monitoring of the virulence and antibiotic resistance of the *L. monocytogenes* strains is

becoming important due to the increasing number of antibiotic-resistant strains isolated from food and industry.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/pathogens11101099/s1, Table S1: Antimicrobial resistance and virulence characteristic of all strains used in the study; Table S2: Primer sequence, product size, PCR protocol, and references used for the detection of antimicrobial resistance genes in *L. monocytogenes*; Table S3: Primer sequence, product size, PCR protocol, and references used for identification, serotyping, and detection of virulence-associated genes in *L. monocytogenes* strains.

Author Contributions: Conceptualization, P.W.; methodology, P.W. and A.J.Z.; validation, A.Z. and W.C.-W.; investigation, P.W., A.J.Z., A.Z., W.C.-W.; writing—original draft preparation, P.W.; writing—review and editing, A.Z. and W.C.-W.; supervision, A.Z. and W.C.-W.; funding acquisition, A.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded in whole by the National Science Centre (Poland) project number 2018/29/B/NZ9/00645 (OPUS-15).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on reasonable request from the corresponding author.

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

References

1. Wiktorczyk-Kapischke, N.; Skowron, K.; Grudlewska-Buda, K.; Wałecka-Zacharska, E.; Korkus, J.; Gospodarek-Komkowska, E. Adaptive Response of *Listeria monocytogenes* to the Stress Factors in the Food Processing Environment. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 710085. [CrossRef] [PubMed]
2. Tabit, F.T. Contamination, Prevention and Control of *Listeria monocytogenes* in Food Processing and Food Service Environments. In *Listeria Monocytogenes*; Nyila, M.A., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2018; Volume 1, pp. 71–85. [CrossRef]
3. Andritsos, N.D.; Paramithiotis, S.; Mataragas, M.; Drosinos, E.H. *Listeria monocytogenes* Serogroup 1/2 Strains Have a Competitive Growth Advantage over Serotype 4b during Refrigerated Storage of an Artificially Contaminated Ready-To-Eat Pork Meat Product. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 6096. [CrossRef]
4. EFSA-ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA J.* **2021**, *19*, 6406. [CrossRef]
5. Bouymajane, A.; Rhazi Filali, F.; Oulghazi, S.; Lafkih, N.; Ed-Dra, A.; Aboulkacem, A.; El Allaoui, A.; Ouhmidou, B.; Moumni, M. Occurrence, antimicrobial resistance, serotyping and virulence genes of *Listeria monocytogenes* isolated from foods. *Heliyon* **2021**, *7*, e06169. [CrossRef] [PubMed]
6. Raschle, S.; Stephan, R.; Stevens, M.J.A.; Cernela, N.; Zurfluh, K.; Muchaamba, F.; Nüesch-Inderbinen, M. Environmental dissemination of pathogenic *Listeria monocytogenes* in flowing surface waters in Switzerland. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 9066. [CrossRef] [PubMed]
7. Hadjilouka, A.; Paramithiotis, S.; Drosinos, E.H. Genetic Analysis of the Listeria Pathogenicity Island 1 of *Listeria monocytogenes* 1/2a and 4b Isolates. *Curr. Microbiol.* **2018**, *75*, 857–865. [CrossRef] [PubMed]
8. Orsi, R.H.; den Bakker, H.C.; Wiedmann, M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int. J. Med. Microbiol.* **2011**, *301*, 79–96. [CrossRef] [PubMed]
9. Matereke, L.T.; Okoh, A.I. *Listeria monocytogenes* virulence, antimicrobial resistance and environmental persistence: A review. *Pathogens* **2020**, *9*, 528. [CrossRef]
10. Société Française de Microbiologie (Ed.) Resistances Naturelles Aux Antibiotiques Des Principales Especes Bacteriennes D'interet Medical. In *CASFM/EUCAST*; Institut Pasteur: Paris, France, 2020; Available online: https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/04/CASFM2020_Avril2020_V1.1.pdf (accessed on 29 June 2022).
11. Lecuit, M.; Leclercq, A. *Rapport Annuel D'activite Du Centre 'National de Reference Des' Listeria e Annee*; Institut Pasteur: Paris, France, 2009; Available online: https://www.pasteur.fr/sites/default/files/rubrique_pro_sante_publique/les_cnr/listeria/cnr-listeria-rapport-2009-site-web.pdf (accessed on 29 June 2022).
12. Teuber, M. Spread of Antibiotic Resistance with Food-Borne Pathogens. *Cell. Mol. Life Sci.* **1999**, *56*, 755–763. [CrossRef]
13. Zakrzewski, A.J.; Zarzecka, U.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A. A Comparison of Methods for Identifying *Enterobacterales* Isolates from Fish and Prawns. *Pathogens* **2022**, *11*, 410. [CrossRef] [PubMed]
14. Ryu, J.; Hong, S.; Seok, Y.; Shrivastav, A.; Lee, S.; Kim, Y.; Kim, H. Simultaneous Detection of *Listeria* Species Isolated from Meat Processed Foods Using Multiplex PCR. *Food Control* **2013**, *32*, 659–664. [CrossRef]

15. Nho, S.W.; Abdelhamed, H.; Reddy, S.; Karsi, A.; Lawrence, M.L. Identification of High-Risk *Listeria monocytogenes* Serotypes in Lineage I (Serotype 1/2a, 1/2c, 3a and 3c) Using Multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.* **2015**, *119*, 845–852. [CrossRef] [PubMed]
16. Zarzecka, U.; Zadernowska, A.; Chajęcka-Wierzchowska, W. Effects of Osmotic and High Pressure Stress on Expression of Virulence Factors among *Enterococcus* spp. Isolated from Food of Animal Origin. *Food Microbiol.* **2022**, *102*, 103900. [CrossRef]
17. Stepanović, S.; Vukovic, D.; Hola, V.; Di Bonaventura, G.; Djukic, S.; Ruzicka, F. Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of Testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by Staphylococci. *APMIS* **2007**, *115*, 891–900. [CrossRef]
18. Chajecka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A.; Łaniewska-Trokenheim, Ł. Virulence Factors, Antimicrobial Resistance and Biofilm Formation in *Enterococcus* spp. Isolated from Retail Shrimps. *LWT Food Sci. Technol.* **2016**, *69*, 117–122. [CrossRef]
19. Zakrzewski, A.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A. Virulence Characterization of *Listeria monocytogenes*, *Listeria Innocua*, and *Listeria Welshimeri* Isolated from Fish and Shrimp Using In Vivo Early Zebrafish Larvae Models and Molecular Study. *Pathogens* **2020**, *9*, 1028. [CrossRef]
20. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *M100Ed30: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 30th ed.; Clinical and Laboratory Standard Institute: Wayne, PA, USA, 2020; ISBN 1-56-23883-8X.
21. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 12.0. Available online: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (accessed on 29 June 2022).
22. Feng, Y.; Yao, H.; Chen, S.; Sun, X.; Yin, Y.; Jiao, X. Rapid Detection of Hypervirulent Serovar 4h *Listeria monocytogenes* by Multiplex PCR. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1309. [CrossRef]
23. Shimojima, Y.; Ida, M.; Nakama, A.; Nishino, Y.; Fukui, R.; Kuroda, S.; Hirai, A.; Kai, A.; Sadamasu, K. Prevalence and Contamination Levels of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods in Tokyo, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **2016**, *78*, 1183–1187. [CrossRef]
24. Korsak, D.; Borek, A.; Daniluk, S.; Grabowska, A.; Pappelbaum, K. Antimicrobial Susceptibilities of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Food and Food Processing Environment in Poland. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *158*, 203–208. [CrossRef]
25. O'Connor, L.; O'Leary, M.; Leonard, N.; Godinho, M.; O'Reilly, C.; Egan, J.; O'Mahony, R. The Characterization of *Listeria* Spp. Isolated from Food Products and the Food-Processing Environment. *Lett. Appl. Microbiol.* **2010**, *51*, 490–498. [CrossRef]
26. Chen, M.; Wu, Q.; Zhang, J.; Wu, S.; Guo, W. Prevalence, Enumeration, and Pheno- and Genotypic Characteristics of *Listeria monocytogenes* Isolated from Raw Foods in South China. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1026. [CrossRef] [PubMed]
27. Swetha, C.S.; Porteen, K.; Elango, A.; Ronald, B.S.M.; Senthil Kumar, T.M.A.; Milton, A.P.; Sureshkannan, S. Genetic Diversity, Virulence and Distribution of Antimicrobial Resistance among *Listeria monocytogenes* Isolated from Milk, Beef, and Bovine Farm Environment. *Iran. J. Vet. Res.* **2021**, *22*, 1–8. [CrossRef]
28. Capita, R.; Felices-Mercado, A.; García-Fernández, C. Characterization of *Listeria monocytogenes* Originating from the Spanish Meat-Processing Chain. *Foods* **2019**, *8*, 542. [CrossRef] [PubMed]
29. Kayode, A.J.; Okoh, A.I. Incidence and Genetic Diversity of Multi-Drug Resistant *Listeria monocytogenes* Isolates Recovered from Fruits and Vegetables in the Eastern Cape Province, South Africa. *Int. J. Food Microbiol.* **2022**, *363*, 109513. [CrossRef]
30. Paramithiotis, S.; Hadjilouka, A.; Drosinos, E.H. Listeria Pathogenicity Island 1. Structure and Function. In *Listeria Monocytogenes: Food Sources, Prevalence and Management Strategies*; Hambrick, E.C., Ed.; Nova Publishers: New York, NY, USA, 2014; pp. 265–282.
31. Sudagidan, M.; Ozalp, V.C.; Öztürk, O.; Yurt, M.N.Z.; Yavuz, O.; Tasbasi, B.B.; Ucak, S.; Mavili, Z.S.; Coban, A.; Aydin, A. Bacterial Surface, Biofilm and Virulence Properties of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Smoked Salmon and Fish Food Contact Surfaces. *Food Biosci.* **2021**, *41*, 101021. [CrossRef]
32. Iwu, C.D.; Okoh, A.I. Characterization of Antibiogram Fingerprints in *Listeria monocytogenes* Recovered from Irrigation Water and Agricultural Soil Samples. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0228956. [CrossRef]
33. Du, X.J.; Zhang, X.; Wang, X.Y.; Su, Y.L.; Li, P.; Wang, S. Isolation and Characterization of *Listeria monocytogenes* in Chinese Food Obtained from the Central Area of China. *Food Control* **2017**, *74*, 9–16. [CrossRef]
34. Janez, N.; Skrlj, B.; Sternisa, M.; Klancnik, A.; Sabotic, J. The Role of the *Listeria monocytogenes* Surfactome in Biofilm Formation. *Microb. Biotechnol.* **2021**, *14*, 1269–1281. [CrossRef]
35. Kayode, A.J.; Semerjian, L.; Osaili, T.; Olapade, O.; Okoh, A.I. Occurrence of Multidrug-Resistant *Listeria monocytogenes* in Environmental Waters: A Menace of Environmental and Public Health Concern. *Front. Environ. Sci.* **2021**, *9*, 737435. [CrossRef]
36. Melian, C.; Bentencourt, E.; Castellano, P.; Ploper, D.; Vignolo, G.; Mendoza, L.M. Biofilm Genes Expression of *Listeria monocytogenes* Exposed to *Latilactobacillus Curvatus* Bacteriocins at 10 °C. *Int. J. Food Microbiol.* **2022**, *370*, 109648. [CrossRef]
37. Hsu, C.; Cairns, L.; Hobley, L.; Abbott, J. Genomic Differences between *Listeria monocytogenes* EGDe Isolates Reveal Crucial Roles for SigB and Wall Rhamnosylation in Biofilm Formation. *J. Bacteriol.* **2020**, *202*, e00692-19. [CrossRef] [PubMed]
38. Wei, L.N.; Shi, C.Z.; Luo, C.X.; Hu, C.Y.; Meng, Y.H. Phloretin Inhibits Biofilm Formation by Affecting Quorum Sensing under Different Temperature. *LWT Food Sci. Technol.* **2020**, *131*, 109668. [CrossRef]
39. Piercey, M.J.; Hingston, P.A.; Truelstrup Hansen, L. Genes Involved in *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation at a Simulated Food Processing Plant Temperature of 15 °C. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *223*, 63–74. [CrossRef]
40. Matle, I.; Mbatha, K.R.; Lentsoane, O.; Magwedere, K.; Morey, L.; Madoroba, E. Occurrence, Serotypes, and Characteristics of *Listeria monocytogenes* in Meat and Meat Products in South Africa between 2014 and 2016. *J. Food Saf.* **2019**, *39*, e12629. [CrossRef]

41. Pereira, S.A.; Alves, Â.; Ferreira, V.; Teixeira, P.C.M. The Impact of Environmental Stresses in the Virulence Traits of *Listeria monocytogenes* Relevant to Food Safety. In *Listeria Monocytogenes*; Nyila, M.A., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2018; Volume 1, pp. 89–108. [CrossRef]
42. Chen, M.; Cheng, J.; Wu, Q.; Zhang, J.; Chen, Y.; Xue, L.; Lei, T.; Zeng, H.; Wu, S.; Ye, Q.; et al. Occurrence, Antibiotic Resistance, and Population Diversity of *Listeria Monocytogenes* isolated from Fresh Aquatic Products in China. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2215. [CrossRef] [PubMed]
43. Tîrziu, E.; Herman, V.; Nichita, I.; Morar, A.; Imre, M.; Ban-Cucerzan, A.; Bucur, I.; Tîrziu, A.; Mateiu-Petrec, O.C.; Imre, K. Diversity and Antibiotic Resistance Profiles of *Listeria monocytogenes* Serogroups in Different Food Products from the Transylvania Region of Central Romania. *J. Food Prot.* **2022**, *85*, 54–59. [CrossRef] [PubMed]
44. Hailu, W.; Helmy, Y.A.; Carney-Knisely, G.; Kauffman, M.; Fraga, D.; Rajashekara, G. Prevalence and Antimicrobial Resistance Profiles of Foodborne Pathogens Isolated from Dairy Cattle and Poultry Manure Amended Farms in Northeastern Ohio, the United States. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1450. [CrossRef]
45. Park, E.; Ha, J.; Oh, H.; Kim, S.; Choi, Y.; Lee, Y.; Kim, Y.; Seo, Y.; Kang, J.; Yoon, Y. High Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Smoked Duck: Antibiotic and Heat Resistance, Virulence, and Genetics of the Isolates. *Food Sci. Anim. Resour.* **2021**, *41*, 324–334. [CrossRef]
46. Mpondo, L.; Ebomah, K.E.; Okoh, A.I. Multidrug-Resistant *Listeria* Species Shows Abundance in Environmental Waters of a Key District Municipality in South Africa. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 481. [CrossRef]
47. Godreuil, S.; Galimand, M.; Gerbaud, G.; Jacquet, C.; Courvalin, P. Efflux pump *Lde* is associated with fluoroquinolone resistance in *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 704–708. [CrossRef]
48. Maung, A.T.; Mohammadi, T.N.; Nakashima, S.; Liu, P.; Masuda, Y.; Honjoh, K.I.; Miyamoto, T. Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken meat in Fukuoka, Japan. *Int. J. Food Microbiol.* **2019**, *2*, 49–57. [CrossRef]
49. Şanlıbaba, P.; Tezel, B.U.; Çakmak, G.A. Prevalence and Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolated from Ready-to-Eat Foods in Turkey. *J. Food Qual.* **2018**, *2018*, 7693782. [CrossRef]
50. Aksoy, A.; Sezer, Ç.; Vatansever, L.; Gülbaz, G. Presence and Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes* in Raw Milk and Dairy Products. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* **2018**, *24*, 415–421. [CrossRef]
51. Srinivasan, V.; Nam, H.M.; Nguyen, L.T.; Tamilselvam, N.; Murinda, S.E.; Oliver, S.P. Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms. *Foodborne Pathog Dis.* **2005**, *2*, 201–211. [CrossRef] [PubMed]
52. Noll, M.; Kleta, S.; Al Dahouk, S. Antibiotic Susceptibility of 259 *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Food, Food-Processing Plants and Human Samples in Germany. *J. Infect. Public Health* **2018**, *11*, 572–577. [CrossRef] [PubMed]
53. Li, L.; Olsen, R.H.; Ye, L.; Wang, W.; Shi, L.; Yan, H.; Meng, H. Characterization of Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from a Pork Processing Plant and Its Respective Meat Markets in Southern China. *Foodborne Pathog. Dis.* **2016**, *13*, 262–268. [CrossRef]
54. Babarandage, H.; Harshani, C.; Ramesh, R.; Halmillawewa, A.P. Phenotypic and Genotypic Characterization of Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolated from Raw Milk Samples Collected from Polonnaruwa, Sri Lanka. *Emir. J. Food Agric.* **2022**, *34*, 16–25. [CrossRef]
55. Moreno, L.Z.; Paixão, R.; Gobbi, D.D.S.; Raimundo, D.C.; Ferreira, T.P.; Moreno, A.M.; Hofer, E.; Reis, C.M.F.; Matté, G.R.; Matté, M.H. Characterization of Antibiotic Resistance in *Listeria* Spp. Isolated from Slaughterhouse Environments, Pork and Human Infections. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2014**, *8*, 416–423. [CrossRef]
56. Escolar, C.; Gómez, D.; Del Carmen Rota García, M.; Conchello, P.; Herrera, A. Antimicrobial Resistance Profiles of *Listeria monocytogenes* and *Listeria Innocua* Isolated from Ready-to-Eat Products of Animal Origin in Spain. *Foodborne Pathog. Dis.* **2017**, *14*, 357–363. [CrossRef]
57. Andriyanov, P.A.; Zhurilov, P.A.; Liskova, E.A.; Karpova, T.I.; Sokolova, E.V.; Yushina, Y.K.; Zaiko, E.V.; Bataeva, D.S.; Voronina, O.L.; Psareva, E.K.; et al. Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Humans, Animals, and Food Products in Russia in 1950–1980, 2000–2005, and 2018–2021. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1206. [CrossRef]
58. Tahoun, A.B.M.B.; Abou Elez, R.M.M.; Abdelfatah, E.N.; Elsohaby, I.; El-Gedawy, A.A.; Elmoslemany, A.M. *Listeria monocytogenes* in Raw Milk, Milking Equipment and Dairy Workers: Molecular Characterization and Antimicrobial Resistance Patterns. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2017**, *10*, 264–270. [CrossRef] [PubMed]
59. Maia, D.S.V.; Haubert, L.; Würfel, S.D.F.R.; Kroning, I.S.; Cardoso, M.R.D.I.; Lopes, G.V.; Fiorentini, Â.M.; Da Silva, W.P. *Listeria monocytogenes* in Sliced Cheese and Ham from Retail Markets in Southern Brazil. *FEMS Microbiol. Lett.* **2020**, *366*, fnz249. [CrossRef] [PubMed]
60. Wieczorek, K.; Dmowska, K.; Osek, J. Prevalence, Characterization, and Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolates from Bovine Hides and Carcasses. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 2043–2045. [CrossRef] [PubMed]
61. Sala, C.; Morar, A.; Tîrziu, E.; Nichita, I.; Imre, M.; Imre, K. Environmental Occurrence and Antibiotic Susceptibility Profile of *Listeria monocytogenes* at a Slaughterhouse Raw Processing Plant in Romania. *J. Food Prot.* **2016**, *79*, 1794–1797. [CrossRef]
62. Zhou, K.; Zhu, D.; Tao, Y.; Xie, L.; Han, L.; Zhang, Y.; Sun, J. New Genetic Context of *Lnu*(B) Composed of Two Multi-Resistance Gene Clusters in Clinical Streptococcus Agalactiae ST-19 Strains. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2019**, *8*, 117. [CrossRef]
63. Granier, S.A.; Moubareck, C.; Colaneri, C.; Lemire, A.; Roussel, S.; Dao, T.T.; Courvalin, P.; Brisabois, A. Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolates from Food and the Environment in France over a 10-Year Period. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 2788–2790. [CrossRef]

Table S1. Antimicrobial resistance and virulence characteristic of all strains used in the study.

No.	Strain	Identification		Serotype	Isolation source	Biofilm	Slime production	Virulence-associated genes		Phenotypic antibiotic resistance	Minimum inhibitory concentration (MIC) (μg/ml)	Antibiotic-resistance genes
		PCR	MALDI-TOF MS					LIPI-1	Biofilm			
Strains from food												
1.	116	*L. monocytogenes*		1/2a	Farm cheese	No biofilm	No	*hlyA, prfA*	*inlB*	DA (I)	DA – 1	*lnuA*
2.	130	*L. monocytogenes*		1/2a	Farm cheese	No biofilm	No	*hlyA, prfA*	*inlB*	DA (I)	DA – 1.5	*lnuA*
3.	137	*L. monocytogenes*		1/2a	Raw milk	Moderate	No	*hlyA, prfA*	*inlB*	DA (R)	DA – 4	-
4.	138	*L. monocytogenes*		1/2a	Raw milk	Moderate	No	*hlyA, prfA*	*inlB*	DA (R)	DA – 4	-
5.	140	*L. monocytogenes*		1/2a	Raw milk	Weak	No	*hlyA, prfA*	*inlB*	DA (R)	DA – 4	-
6.	141	*L. monocytogenes*		1/2a	Frozen vegetables	No biofilm	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (I)	DA – 2	*mefA, lnuA*
7.	142	*L. monocytogenes*		1/2a	Frozen vegetables	No biofilm	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (I)	DA – 1	*lnuA*
8.	147	*L. monocytogenes*		1/2a	Dumplings	No biofilm	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (I)	DA – 1.5	*mefA, lnuA*
9.	148	*L. monocytogenes*		1/2a	Frozen vegetables	No biofilm	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	CN (I), SXT (R)	CN – 0.19, SXT – 0.064	*aadB, mefA, lnuA, sulII*
10.	91	*L. monocytogenes*		1/2a	Juice	No biofilm	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	-	NA	NA
11.	92	*L. monocytogenes*		1/2a	Juice	No biofilm	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (R), MEM (R), SXT (R)	DA – 2, MEM – 0.047, SXT – 0.064	*sulI*
12.	93	*L. monocytogenes*		1/2a	Frozen vegetable	No biofilm	Yes	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (R)	DA – 32	*lnuA*
13.	94	*L. monocytogenes*		1/2a	Frozen vegetable	No biofilm	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (I)	DA – 1	-
14.	95	*L. monocytogenes*		1/2a	Frozen vegetable	No biofilm	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (I)	DA – 1.5	-
15.	96	*L. monocytogenes*		1/2a	Chicken wings	No biofilm	Yes	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	-	NA	NA
16.	98	*L. monocytogenes*		1/2a	Farm cheese	No biofilm	Yes	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	CIP (I), DA (I)	CIP – 0.38, DA – 1.5	*Ide*
17.	99	*L. monocytogenes*		1/2a	Farm cheese	Moderate	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (I)	DA – 1	*mefA*
18.	139	*L. monocytogenes*		1/2a	Raw milk	Moderate	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (R)	DA – 4	-
19.	117	*L. monocytogenes*		1/2c	Raw milk	No biofilm	No	*hlyA, prfA*	*inlB*	-	NA	NA
20.	129	*L. monocytogenes*		1/2c	Raw milk	No biofilm	No	*hlyA, prfA*	*luxS*	DA (I)	DA – 1.5	-
21.	146	*L. monocytogenes*		3c	Frozen vegetables	No biofilm	No	*hlyA, prfA*	*inlB, sigB*	CIP (I), DA (I)	CIP – 0.50, DA – 1.5	*Ide, mefA, lnuA*
22.	149	*L. monocytogenes*		3c	Frozen vegetables	No biofilm	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (I)	DA – 2	*mefA, lnuA*
23.	81	*L. monocytogenes*		3c	Frozen vegetable	Strong	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (R)	DA – 4	-
24.	97	*L. monocytogenes*		3c	Chicken breast fillet	No biofilm	Yes	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (R)	DA – 1.5	-
25.	143	*L. monocytogenes*		Other	Frozen vegetable	No biofilm	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (R)	DA – 4	*lnuA*
26.	144	*L. monocytogenes*		Other	Frozen vegetable	Strong	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (I)	DA – 2	*mefA, lnuA*
27.	145	*L. monocytogenes*		Other	Frozen vegetable	No biofilm	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (I)	DA – 2	*mefA, lnuA*
Strains from food processing environments												
1.	172	*L. monocytogenes*		1/2a	Floor drain	Weak	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (I)	DA – 1.5	-
2.	167	*L. monocytogenes*		1/2a	Floor drain	Moderate	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (I)	DA – 1.5	-
3.	165	*L. monocytogenes*		1/2c	Floor drain	Weak	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	P (R), SXT (R)	P – 1, SXT – 0.125	*mefA, sulI*
4.	168	*L. monocytogenes*		1/2c	Floor drain	Strong	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (I)	DA - 2	*lnuA*
5.	169	*L. monocytogenes*		1/2c	Venting system	No biofilm	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (R)	DA – 4	-
6.	170	*L. monocytogenes*		1/2c	Production machine	Moderate	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (R)	DA – 4	-
7.	174	*L. monocytogenes*		1/2c	Production machine	Weak	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (I), SXT (R)	DA – 1.5, SXT – 0.l25	*sulI*
8.	176	*L. monocytogenes*		1/2c	Production machine	No biofilm	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (I)	DA – 1.5	-
9.	177	*L. monocytogenes*		1/2c	Production line	Weak	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (I), SXT (R)	DA – 1, SXT – 0.064	*sulI, sulII*
10.	164	*L. monocytogenes*		3a	Production line	No biofilm	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (I)	DA – 2	-
11.	173	*L. monocytogenes*		3a	Production line	Moderate	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (I)	DA – 2	-
12.	166	*L. monocytogenes*		3c	Production line	Moderate	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (R)	DA – 4	-
13.	171	*L. monocytogenes*		3c	Production line	Weak	No	*hlyA, prfA*	*inlB, luxS, sigB*	DA (I)	DA – 2	-

Food processing enviornments

I – Intermediate, R – Resistance; NA – not applicable; AMP – Ampicillin, C – Chloramphenicol, CIP – Ciprofloxacin, E – Erythromycin, CN – Gentamicin, DA – Clindamycin, MEM – Meropenem, P – Penicillin G, RD – Rifampicin, SXT – Trimethoprim/Sulfamethoxazole, TE – Tetracycline, VA – Vancomycin.

Table S2. Primer sequence, product size, PCR protocol, and references used for the detection of antimicrobial resistance genes in *L. monocytogenes*.

Antimicrobial agent	Target Genes	Primer Sequence (5′–3′)	Product Size (bp)	Concentration	PCR cycling condition	Reference
CIP	*Lde*	F: ATCGTGAACTTAATGGTGG R: ATCCTCATATAACTCAAGCG	1518	0.2 μM	Initial denaturation for 3 min at 95 °C, followed by 1 min of denaturation at 95 °C, 45 s annealing at 45 °C, 1 min of extension at 72 °C for a total of 35 cycles and 5 min of final extension at 72 °C.	[47]
DA	*lnuA*	F: GGTGGCTGGGGGGTAGATGTATTAACTGG R: GCTTCTTTTGAAATACATGGTATTTTTCGATC	323	0.4 μM	Initial denaturation for 5 min at 94 °C, followed by 1 min of denaturation at 94 °C, 1 min annealing at 59 °C, 2 min of extension at 72 °C for a total of 35 cycles and 5 min of final extension at 72 °C.	[56]
	lnuB	F: CCTACCTATTGTTTGTGGAA R: ATAACGTTACTCTCCTATTC	405	1 μM	Initial denaturation for 5 min at 94 °C, followed by 1 min of denaturation at 94 °C, 1 min annealing at 54 °C, 2 min of extension at 72 °C for a total of 35 cycles and 5 min of final extension at 72 °C.	
	mefA	F: AGTATCATTAATCACTAGTGC R: TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG	345	0.2 μM	Initial denaturation for 3 min at 95 °C, followed by 1 min of denaturation at 95 °C, 45 s annealing at 50 °C, 1 min of extension at 72 °C for a total of 35 cycles and 5 min of final extension at 72 °C.	[48]
CN	*aadB*	F: GAGCGAAATCTGCCGCTCTTG R: CTGTTACAACGGACTGGCCGC	310	0.2 μM	Initial denaturation for 5 min at 95 °C, followed by 1 min of denaturation at 95 °C, 30 s annealing at 53 °C, 30 s of extension at 72 °C for a total of 40 cycles and 5 min of final extension at 72 °C.	[51]
	aac(3)-IIa(aacC2)[a]	F: CGGAAGGCAATAACGGAG R: TCGAACAGGTAGCACTGAG	740	0.5 μM	Initial denaturation for 5 min at 94 °C, followed by 30 s of denaturation at 94 °C, 30 s annealing at 50 °C, 1,5 min of extension at 72 °C for a total of 30 cycles and 5 min of final extension at 72 °C.	[35]
P	*penA*	F: ATCGAACAGGCGACGATGTC R: GATTAAGACGGTGTTTTACGG	500	0.2 μM	Initial denaturation for 3 min at 95 °C, followed by 1 min of denaturation at 95 °C, 45 s annealing at 46 °C, 1 min of extension at 72 °C for a total of 35 cycles and 5 min of final extension at 72 °C.	[51]
SXT	*sulI*	F: CGGCGTGGGCTACCTGAACG R: GCCGATCGCGTGAAGTTCCG	433	0.2 μM	Initial denaturation for 5 min at 94 °C, followed by 30 s of denaturation at 94 °C, 30 s annealing at 65 °C, 2 min of extension at 72 °C for a total of 30 cycles and 10 min of final extension at 72 °C.	[32]
	sulII	F: GCGCTCAAGGCAGATGGCATT R: GCGTTTGATACCGGCACCCGT	293	0.2 μM	Initial denaturation for 5 min at 94 °C, followed by 30 s of denaturation at 94 °C, 30 s annealing at 65 °C, 2 min of extension at 72 °C for a total of 30 cycles and 10 min of final extension at 72 °C.	

CIP – Ciprofloxacin, CN – Gentamicin, DA – Clindamycin, MEM – Meropenem, P – Penicillin G, SXT – Trimethoprim/Sulfamethoxazole.

Table S3. Primer sequence, product size, PCR protocol, and references used for identification, serotyping, and detection of virulence-associated genes in *L. monocytogenes* strains.

Species/Gene/Serovar specificity		Primer Sequence (5′–3′)	Product Size (bp)	PCR cycling condition	Reference
Identification					
Listeria genus ***- prs***		F: GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG R: CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG	370	Initial denaturation for 5 min at 94°C, followed by 30 s of denaturation at 94°C, 30 s annealing at 60°C, 30 s of extension at 72°C for a total of 35 cycles and 5 min of final extension at 72°C.	[9]
L. monocytogenes ***- lmo1030***		F:GCTTGTATTCACTTGGATTTGTCTGG R: ACCATCCGCATATCTCAGCCAACT	509		
Serotyping					
Serotype 1/2a and some serotype 3a strains ***- flaA* (lm_0690)**		F: TTACTAGATCAAACTGCTCC R: AAGAAAAGCCCCCTCGTCC	538	Initial denaturation for 3 min at 94°C, followed by 30 s of denaturation at 94°C, 30 s annealing at 52°C, 1 min of extension at 72°C for a total of 30 cycles and 5 min of final extension at 72°C.	[10]
Serotype 1/2c strains ***- LMOSLCC2372_0308***		F: ATGCAACATCAAGAGCAAGAA R: TGGCATTTCTAAGGATGTCTCT	300		
Most serotype 3a strains ***- LMLG_0742***		F: TGAGTTTGCAGGAAAGAAGG R: AACCGTGGTTGGAACTGTAA	388		
Virulence-associated genes					
LIPI-1	*hlyA*	F: GCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA R: GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG	456	Initial denaturation for 3 min at 94°C, followed by 30 s of denaturation at 94°C, 30 s annealing at 55°C, 1 min of extension at 72°C for a total of 35 cycles and 5 min of final extension at 72°C.	[14]
	prfA	F: GATACAGAAACATCGGTTGGC R: GTGTAATCTTGATGCCATCAGG	274	Initial denaturation for 3 min at 94°C, followed by 30 s of denaturation at 94°C, 30 s annealing at 49°C, 1 min of extension at 72°C for a total of 35 cycles and 5 min of final extension at 72°C.	
Biofilm	*inlB*	F: AAAGCACGATTTCATGGGAG R: ACATAGCCTTGTTTGGTCGG	148		
	luxS	F: ATGGCAGAAAAAATGAATGTAGAAA R: TTATTCACCAAACACATTTTTCCA	500		
	sigB	F: TCATCGGTGTCACGGAAGAA R: TGACGTTGGATTCTAGACAC	310	Initial denaturation for 3 min at 94°C, followed by 30 s of denaturation at 94°C, 30 s annealing at 51°C, 1 min of extension at 72°C for a total of 35 cycles and 5 min of final extension at 72°C.	

Olsztyn, dn. 08.06.2026 r.
(miejscowość, data)

mgr inż. Patryk Wiśniewski
(imię i nazwisko kandydata)
Technologia żywności i żywienia
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE
autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: *Antimicrobial Resistance and Virulence Characterization of Listeria monocytogenes Strains Isolated from Food and Food Processing Environments* (Wiśniewski P., Zakrzewski A., Zadernowska A., Chajęcka-Wierzchowska W. 2022. *Antimicrobial Resistance and Virulence Characterization of Listeria monocytogenes Strains Isolated from Food and Food Processing Environments*. Pathogens, 11, 1099. https://doi.org/10.3390/pathogens11101099) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich dyskusji na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny).

Wiśniewski Patryk
(podpis kandydata)

Olsztyn, dn. 08.06.2026 r.
(miejscowość, data)

dr inż. Arkadiusz Józef Zakrzewski
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem *Antimicrobial Resistance and Virulence Characterization of Listeria monocytogenes Strains Isolated from Food and Food Processing Environments* (Wiśniewski P., Zakrzewski A., Zadernowska A., Chajęcka-Wierzchowska W. 2022. *Antimicrobial Resistance and Virulence Characterization of Listeria monocytogenes Strains Isolated from Food and Food Processing Environments*. Pathogens, 11, 1099. https://doi.org/10.3390/pathogens11101099) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: współtworzeniu metodyki badawczej, wstępnej obróbce danych oraz współpracy przy przygotowaniu części tekstu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Patryka Wiśniewskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Patryka Wiśniewskiego polegający na: udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich dyskusji na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny).

Zakrzewski Arkadiusz

podpis

Olsztyn, dn. 08.06.2026 r.
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem *Antimicrobial Resistance and Virulence Characterization of Listeria monocytogenes Strains Isolated from Food and Food Processing Environments* (Wiśniewski P., Zakrzewski A., Zadernowska A., Chajęcka-Wierzchowska W. 2022. *Antimicrobial Resistance and Virulence Characterization of Listeria monocytogenes Strains Isolated from Food and Food Processing Environments*. Pathogens, 11, 1099. https://doi.org/10.3390/pathogens11101099) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: weryfikacji części badań laboratoryjnych, wprowadzeniu poprawek merytorycznych do tekstu oraz udziale w ostatecznym redagowaniu manuskryptu

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Patryka Wiśniewskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Patryka Wiśniewskiego polegający na: udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich dyskusji na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny).

Wioleta Chajęcka-Wierzchowska
.....
podpis

Olsztyn, dn. 08.06.2026 r.
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Anna Zadernowska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem *Antimicrobial Resistance and Virulence Characterization of Listeria monocytogenes Strains Isolated from Food and Food Processing Environments* (Wiśniewski P., Zakrzewski A., Zadernowska A., Chajęcka-Wierzchowska W. 2022. *Antimicrobial Resistance and Virulence Characterization of Listeria monocytogenes Strains Isolated from Food and Food Processing Environments*. Pathogens, 11, 1099. https://doi.org/10.3390/pathogens11101099) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: walidacji zastosowanych metod, poprawie merytorycznej treści manuskryptu oraz nadzorze naukowym prac eksperymentalnych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Patryka Wiśniewskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Patryka Wiśniewskiego polegający na: udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich dyskusji na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny).

Anna Zadernowska
.....
podpis

Załącznik nr 2

Publikacja P2

Wiśniewski, P., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2023). High-Pressure Processing – Impacts on the Virulence and Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolated from Food and Food Processing Environments. *Foods*, 12, 3899. https://doi.org/10.3390/foods12213899

MNiSW – 140; IF – 4.7; ^{WoS} – 13; GS – 17; RG – 15

foods

MDPI

Article

High-Pressure Processing—Impacts on the Virulence and Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolated from Food and Food Processing Environments

Patryk Wiśniewski *, Wioleta Chajęcka-Wierzchowska and Anna Zadernowska

Department of Food Microbiology, Meat Technology and Chemistry, Faculty of Food Science, University of Warmia and Mazury, Plac Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn, Poland; wioleta.chajecka@uwm.edu.pl (W.C.-W.); anna.zadernowska@uwm.edu.pl (A.Z.)
* Correspondence: patryk.wisniewski@uwm.edu.pl

Abstract: High-pressure processing (HPP) is one of the non-thermal methods of food preservation considered to be safe but may cause an increase/decrease in virulence potential and antibiotic resistance. The aim of the present study was to evaluate the survival of *L. monocytogenes* isolates after high-pressure processing (200 and 400 MPa for 5 min) and to determine changes in phenotypic and genotypic antibiotic resistance and virulence after this treatment. The 400 MPa treatment was shown to be effective in reducing pathogens to safe levels; however, the potential for cell recovery during storage was observed. In addition, studies on changes in virulence indicated possibilities related to a decrease in *actA* gene expression, overexpression of the *hly* and *osfX* gene, and an increase in biofilm-forming ability. The studies on changes in antibiotic resistance of isolates showed that all isolates showing initial susceptibility to lincomycin, fosfomycin, trimethoprim/sulfamethoxazole, and tetracycline became resistant to these antibiotics, which was associated with an increase in the values of minimum inhibitory concentrations. An increase in the expression of antibiotic resistance genes (mainly *tetA_1*, *tetA_3*, *tetC*) was also observed (mainly after the application of 200 MPa pressure), which was isolate dependent. However, it is noteworthy that the induced changes were permanent, i.e., they persisted even after the restoration of optimal environmental conditions. The results presented in our work indicate that the stress occurring during HPP can affect both phenotypic and genotypic changes in the virulence and antibiotic resistance potential of pathogens isolated from food and food processing environments. The potential associated with cell recovery and persistence of changes may influence the spread of virulent isolates of pathogens with increased antibiotic resistance in the food and food processing environment.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; high-pressure processing; antibiotic resistance; virulence factors; gene expressions; food; food processing environment

check for updates

Citation: Wiśniewski, P.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A. High-Pressure Processing—Impacts on the Virulence and Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolated from Food and Food Processing Environments. *Foods* **2023**, *12*, 3899. https://doi.org/10.3390/foods12213899

Academic Editors: Lucia Birošová and Jana Koščová

Received: 22 September 2023
Revised: 20 October 2023
Accepted: 23 October 2023
Published: 24 October 2023

Copyright: © 2023 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

Listeria monocytogenes is one of the most dangerous pathogens posing a threat to public health and the food industry [1]. *L. monocytogenes* is a major concern in the food industry due to its ability to survive in various food preservation conditions. This pathogen can trigger stress response mechanisms, making it challenging to ensure safe and high-quality food. *L. monocytogenes* causes listeriosis, a severe illness, especially dangerous for high-risk individuals such as the elderly, pregnant women, newborns, and immunocompromised individuals. [2]. In 2021, 30 countries reported 2268 confirmed cases of listeriosis in the European Union (EU) and the European Economic Area (EEA). Listeriosis is one of the most serious foodborne diseases with the highest rate of hospitalized cases among all zoonotic diseases under EU surveillance. The occurrence of *L. monocytogenes* (in 2021) varied by food category. The highest values were observed for fish and fishery products, beef or pork

meat products, fruits and vegetables, and hard cheeses made from raw or low-heat-treated sheep's milk (4.6%) [3,4].

L. monocytogenes has several different stress response mechanisms related to the alternative sigma factors σB, σC, σH, and σL; the most significant response is σB, which controls over 300 stress and virulence genes [5,6]. The presence of so many different factors that influence the pathogenicity of these bacteria affects the need for constant monitoring of their occurrence in food. Food testing is limited to only determining the presence and abundance of this pathogen, and according to European Commission Regulation 2073/2005 [7], monitoring the presence of *L. monocytogenes* in products where its growth is possible should be conducted before these products enter the market. In such products, *L. monocytogenes* should not be present in 25 g of a sample. Additionally, throughout the product's shelf life, the number of these bacteria in a sample must not exceed 100 cfu/g. Due to the ability of *L. monocytogenes* to possess cell regeneration of sublethally damaged cells, research should include evaluation of the growth potential of these bacteria during storage [1].

Nowadays, non-thermal methods of food preservation are gaining considerable popularity, among which one of the leading methods is high-pressure processing (HPP). This method is considered to be an innovative strategy to minimize negative impacts on food, and it is gaining much popularity. However, HPP may also affect the activation of stress response mechanisms, including resistance regulation systems, oxidative stress systems, and cell repair systems, among others [8]. Important aspects that have not yet been addressed in the scientific research are issues related to the induction of pathogenicity of *L. monocytogenes* isolates and the expression of antibiotic resistance and virulence genes after a preliminary exposure to HPP [9].

Environmental stress induced by food preservation methods has a significant impact on changes in the antibiotic resistance of microorganisms. Only a few studies have focused on examining the interaction related to the tolerance of isolates to HPP-induced stress and their antibiotic resistance [10,11]. Currently, there are no studies that have focused on the effect of HPP on the potential for increased antibiotic resistance and issues related to the expression of antibiotic resistance and virulence genes of *L. monocytogenes* isolates. Therefore, in response to the need to understand the effect of HPP on the antibiotic resistance and virulence of *L. monocytogenes,* the aims of this study were: (i) to evaluate the survival of *L. monocytogenes* isolates after HPP treatment; (ii) to determine changes in phenotypic and genotypic antibiotic resistance among *L. monocytogenes* after HPP treatment; (iii) to observe changes in phenotypic and genotypic virulence (biofilm and slime production abilities) of isolates among *L. monocytogenes* after HPP treatment.

2. Materials and Methods

2.1. Characteristics of the Isolates Used in This Study

This study was conducted on isolates from food and food processing environments, from a collection of isolates of the Department of Food Microbiology, Meat Technology and Chemistry of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn described in a previous study [12]. A total of six isolates were selected for the study. The critera for selecting the isolates used in this study were to belong to one of two serotypes, i.e., 1/2c or 1/2a, and intermediate resistance or resistance to at least one antibiotic.

Before use, the isolates were stored at −80 °C in microbanks (Biomaxima, Lublin, Poland). Microorganisms were cultured on Tryptic Soy Broth (TSB; Merck, Darmstadt, Germany) at 37 °C for 24 h. For further analysis, 2 mL of each culture was transferred to TSB broth and incubated under the same conditions. The characteristics of the isolates selected for analysis are presented in Table 1.

Table 1. Isolate characterization.

Isolate	Serotype	Isolation Source	Biofilm	Slime Production	LIPI-1	Antibiotic MICs [μg/mL]	Antibiotic Resistance Genes
Lm_1 168	1/2c	Floor drain	Strong	No	*hlyAprfA*	DA—2 (I)	*lnuA*
Lm_2 165	1/2c	Floor drain	Weak	No	*hlyAprfA*	P—1 (R) SXT—0.125 (R)	*mefA*, *sulI*
Lm_3 177	1/2c	Production line	Weak	No	*hlyAprfA*	DA—1 (I) SXT—0.064 (R)	*sulI*, *sulII*
Lm_4 92	1/2a	Juice	Strong	No	*hlyAprfA*	DA—2 (R) MEM—0.047 (R) SXT (R)—0.064 (R)	*sulI*
Lm_5 167	1/2a	Floor drain	Moderate	No	*hlyAprfA*	DA—1.5 (I)	-
Lm_6 148	1/2a	Frozen vegetables	No biofilm	No	*hlyAprfA*	CN—0.19 (I) SXT—0.064 (R)	*aadB*, *mefA*, *lnuA*, *sulII*

LIPI-1—Listeria pathogenicity island-1; MIC—minimum inhibitory concentration; I—intermediate; R—resistance; DA—clindamycin, CN—gentamicin, MEM—meropenem, P—penicillin, SXT—trimethoprim/sulfamethoxazole.

2.1.1. Phenotypic Antibiotic Resistance Analysis and Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Value

Previous studies [12] have characterized *L. monocytogenes* isolates for resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT), tetracycline (TET), ciprofloxacin (CIP) and clindamycin (DA). The MIC values were determined only for the antibiotics to which the isolates showed resistance. However, additional analyses were conducted to determine MIC values for all antibiotics. Furthermore, resistance analyses were performed for two more antibiotics, i.e., lincomycin (LIN) and fosfomycin (FOS). As a result, each isolate was characterized for resistance and MIC values for seven antibiotics—SXT, TET, CIP, DA, LIN, and FOS. As criteria for the selection of antibiotics for the study, the possibility of using the antibiotic for the treatment of listeriosis and emerging reports of increased resistance to these antibiotics among *L. monocytogenes* were used.

The testing was performed using the 96-well broth microdilution method as recommended by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST 2022) [13] and ISO 20776-1 [14], according to the previously described paper by Gajewska et al. (2022) [15]. Briefly, the prepared 96-well microtiter plates contained 50 μL cation-adjusted Mueller–Hinton broth (Merck, Darmstadt, Germany) with twice the concentration of the antibiotic solution and were inoculated with 50 μL of the culture suspension (0.5° McFarland scale). The final concentration ranges used to determine the MIC for the antibiotics tested were as follows: LIN, 0.125–256 μg/mL; FOS, 0.125–256 μg/mL; SXT, 0.0625–32 μg/mL; TET, 0.125–64 μg/mL; CIP, 0.008–16 μg/mL; DA, 0.0625–32 μg/mL. The 96-well microtiter plates were sealed and incubated at 35 ± 2 °C for 20 h. The MIC value was recorded as the lowest antibiotic concentration at which no visible growth was observed in the wells of the microtiter plates with reference to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [16]. The results were interpreted as resistant (R), intermediate (I), or susceptible (S) using standard reference values according to EUCAST [13] for *L. monocytogenes*. Additionally, the standards for Staphylococci were used due to the lack of standards for antibiotics not included in EUCAST for *L. monocytogenes*.

2.1.2. Presence of Virulence and Antibiotic Resistance Genes

A previous study [12] analyzed the presence of two LIPI-1 genes, i.e., *hlyA* and *prfA*. In the current study, a further analysis was carried out to evaluate the presence of the following virulence-associated genes included in LIPI-1: *actA*, *plcA*, *plcB*, *mpl*, and *osfX*,

which are considered to be the main virulence genes in *L. monocytogenes* Additionally, the presence of eight antibiotic resistance genes encoding resistance to antibiotics used in the treatment of human and animal listeriosis *(lin*, *fosX*, *mprF*, *sulI*, *tetC*, *tetA_1*, *tetA_3*, and *dfrA)* was also examined.

In short, DNA was isolated first. For that, the isolates were streaked on tryptic soy agar (TSA) (Merck, Darmstadt, Germany) from broth cultures (TSB; Merck, Darmstadt, Germany). After a 24-h incubation at 37 °C, genomic DNA isolation using a Genomic Mini DNA Isolation Kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) proceeded according to the manufacturer's instructions. The obtained genomic DNA samples were stored at −20 °C until further analysis in 200 µL Tris-HCl buffer (10 mM, pH 8.5). The presence of fifteen genes was tested by real-time PCR method in all isolates using specific primers and conditions previously described by Zakrzewski et al. (2023) [17]. Amplifications were performed in 10 µL of the Master Mix reaction containing 5 µL of PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), 1 µL of forward and reverse primer (800 nM/µL), and 1 µL of extracted DNA, filled up with ddH2O to a final volume. The PCR run was performed using a RotorGene Q system (Qiagen Inc., Montreal, ON, Canada). All the PCR runs were performed using positive controls and RNase-free water as a negative control. The real-time PCR conditions were as follows: 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min (initial denaturation), 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 s at an annealing temperature specific to each analyzed gene. The specificity of the real-time PCR product was evaluated by constructing the melting curve using a gradual rise between 60 and 95 °C with 0.5 °C increments for 5 s. The sequences of the primers and annealing temperatures are presented in Table S1.

2.2. High-Pressure Processing

Each of the tested isolates of *L. monocytogenes* was exposed to stress induced by high-pressure processing. In short, 10 mL of a 24-hour culture of each of the isolates analyzed in TSB (Merck, Darmstadt, Germany) was transferred to low-density polyethylene bottle (Kautex, Bonn, Germany) and subjected to HPP treatments. Two pressure variants (200 MPa and 400 MPa for 5 min) were used in the study. The process parameters were selected based on preliminary studies conducted, the latest literature, and the potential for industrial HPP applications in food preservation. HPP was carried out in a glycol-water solution (1:1, *v*/*v*) using a U4040 high-pressure single chamber (IWC PAN, Warsaw, Poland, Unipress Equipment Division) at a temperature of 20 ± 3 °C. The rate of pressure build-up was 300 MPa/min, while the pressure relief time was <5 s. For each tested isolate, the assays were performed in three independent processes. After the HPP treatments were completed, further steps of this study proceeded. Unpressurized samples were used as a control.

2.2.1. Survival and Recovery Analysis after HPP

The survival of the isolates was checked by the plate count method. For this purpose, a series of ten-fold dilutions was made for each isolate before and after exposure to HPP, and then the number of colony-forming units (CFU/mL) was determined on ALOA agar (agar for *Listeria* according to Ottaviani and Agosti, Merck, Darmstadt, Germany). The number of colonies was counted after 48 h of incubation at 37 °C. The number of CFU/mL was determined immediately after the high-pressure treatment.

If viable cells (not culturable) were not detected by the plate count method (cell count below the detection limit), cells were attempted to be recovered during storage, according to Valdramidis et al. (2015) [18] with our own modifications. The presence or absence of *L. monocytogenes* was monitored immediately after the HPP treatment and during storage (at 1-day intervals until growth was detected, at 30 °C). Briefly, after the HPP treatment, 1 mL of each bacterial culture was transferred to a fresh TSB medium (Merck, Darmstadt, Germany) and incubated at 30 °C to allow cell recovery. Then, the suspension was streaked on TSA medium (Merck, Darmstadt, Germany) after the growth of each isolate was observed (in triplicate). All TSA plates were incubated at 30 °C for 48 h. If growth occurred on the

plates, five random colonies were confirmed by culture on ALOA agar (Merck, Darmstadt, Germany) and incubation at 37 °C for 24 h. The entire experiment was repeated on three separate occasions. After recovery, the isolates were cultured on fresh, sterile TSB (Merck, Darmstadt, Germany) and immediately subjected to the next stages of the study.

2.2.2. Change in Phenotypic Antibiotic Resistance Analysis

After applying HPP, the determination of MIC values for six antibiotics proceeded (LIN, FOS, SXT, TET, CIP, and DA). Changes in MIC values were performed directly after stress treatment (200 MPa/5 min), after restoring optimal growth conditions (isolates were cultured in the medium of optimal composition and incubated under optimal conditions), and after the recovery of cells during storage (after exposure to 400 MPa/5 min). MIC values were determined using the methodology described previously in this article (Section 2.1.1. Phenotypic Antibiotic Resistance Analysis and Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Value). MIC values were read after a 20-h incubation at 35 ± 2 °C. The MIC value was considered to be the lowest antibiotic concentration at which no visible growth was observed in the microtiter plate wells. Values were referenced to CLSI [16] and EUCAST [13] guidelines. Results were interpreted as susceptible, intermediate resistant, or resistant.

2.2.3. Real-Time PCR Analysis

RNA Extraction and Reverse Transcription into cDNA

A Total RNA Mini Plus Kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) was used to isolate total RNA. After isolation, purification and concentration proceeded according to the manufacturer's recommendations for the CleanUp RNA Concentrator kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland). Each RNA sample was subjected to integrity testing by loading 10 µL of RNA into a 1.2% agarose gel in 0.5% TBE buffer and running at 90 V for 1 h. Then, the two bands, 16S and 23S RNA, were visualized by fluorescent staining using a G-BOX F3 gel documentation and analysis system (Syngene, Cambridge, UK). The concentration and purity of the RNA samples were measured by sample absorbance at 260 nm and 280 nm, using a DeNovix DS11 FX spectrophotometer/fluorometer (DeNovix Inc., Wilmington, NC, USA). In the next step, RNA was transcribed into cDNA using the TranScriba kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) to synthesize the first strand of cDNA using recombinant MMLV reverse transcriptase, which shows optimal activity at 37–42 °C and low RNAse activity. Random sequence hexameters were used as primers, and the RNA template was protected with a recombinant RNAse inhibitor.

Genes Expression

The study evaluated the expression of fifteen genes, i.e., seven virulence-associated genes included in LIPI-1 (*prfA*, *hly*, *actA*, *plcA*, *plcB*, *mpl*, and *osfX*) and eight antibiotic resistance genes (*lin*, *FosX*, *mprF*, *sulI*, *tetC*, *tetA_1*, *tetA_3*, and *dfrA*) in three independently run reactions, fluorometrically using SYBR green with the RotorGene Q system (Qiagen Inc., Montreal, ON, Canada). The qPCR reactions were performed as previously described by Zakrzewski et al. (2023) [17]. Briefly, 5 µL of PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), 1 µL of forward and reverse primer (800 nM/µL), and 1 µL of extracted cDNA, filled up with ddH2O to a final volume (10 µL). Cycling conditions were as follows: 50 °C for 2 min, an initial denaturation step of 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C, and 60 s at an annealing temperature specific to each analyzed gene. The sequences of the primers and annealing temperatures are presented in Table S1. The melting curve was constructed by heating in a slow ramp between 60 and 95 °C in increments of 0.5 °C for 5 s. To determine the expression level of the analyzed genes, a gene encoding 16S rRNA was selected as the housekeeping gene. Samples were tested for differences in gene expression using relative quantification (normalizing gene expression to the housekeeping gene) according to the mathematical model described by Pfaffl (2001) [19]. A threshold was determined by the software for real-time PCR reactions.

Expression ratios of 2 or more indicated a significant increase in gene expression, while expression ratios of 0.5 or less indicated a significant decrease in gene expression.

2.2.4. Changes in Biofilm and Slime Production Abilities

After the HPP treatments, changes in biofilm formation ability proceeded using the microtiter plate (MTP) method, previously proposed by Stepanović et al. (2007) [20] and as described by Wiśniewski et al. (2022) [12]. Briefly, the ability to produce a biofilm was tested on 96-well, flat-bottomed, sterile polystyrene plates (Promed®). The strength of biofilm formation was determined by measuring absorbance at 570 nm using a spectrophotometric microplate reader Varioscan LUX (Thermo Scientific, San José, CA, USA). The optical density (OD) for each test isolate was examined by taking three replicate measurements at 20 locations in each well. The obtained values were compared with the OD cutoff (ODc) value, which was set as three times the standard deviation above the mean OD of the negative control, which was only BHI broth (Merck, Darmstadt, Germany). The scale proposed by Stepanović et al., 2007 [20] was used to evaluate an isolate's ability to form biofilm. According to this scale, no biofilm production is an OD value less than or equal to the ODc value, weak biofilm production is ODc < OD $\leq$ 2x ODc, moderate biofilm production is 2x ODc < OD $\leq$ 4x ODc, and strong biofilm production is 4x ODc < OD.

Changes in slime production ability were tested using the Congo red agar (CRA) method described previously by [21]. Briefly, the cultures, immediately after HPP, were applied directly to the CRA medium and incubated (37 °C/24 h). After incubation, the plates were stored at room temperature (23 °C) for 48 h. The ability to produce slime was interpreted based on the phenotype of the colonies; black colonies were considered to be positive slime production and dark red and red colonies were considered to be negative slime production.

3. Results

3.1. Survival Analysis

The survival analysis of the isolates in response to the two pressures was carried out using plate count methods. The application of a pressure of 200 MPa was ineffective in inactivating all six *L. monocytogenes* isolates. However, a pressure of 400 MPa was effective in reducing the number of viable cells below the detection limit (Table 2). The isolates were subjected to recovery after treatment of 400 MPa pressure. The recovery ability of all isolates after 72 h of storage was found.

Table 2. The viable cell counts of *L. monocytogenes* isolates analyzed in this study.

	Control *	200 MPa *	400 MPa *	Recovery after 400 MPa
Lm_1	$7.15 \pm 0.22 \times 10^9$	$2.18 \pm 0.15 \times 10^9$	<10	Yes
Lm_2	$2.70 \pm 0.20 \times 10^9$	$1.44 \pm 0.10 \times 10^9$	<10	
Lm_3	$1.91 \pm 0.10 \times 10^9$	$1.64 \pm 0.11 \times 10^9$	<10	
Lm_4	$2.26 \pm 0.21 \times 10^9$	$1.87 \pm 0.25 \times 10^9$	<10	
Lm_5	$2.68 \pm 0.10 \times 10^9$	$1.35 \pm 0.12 \times 10^9$	<10	
Lm_6	$2.08 \pm 0.19 \times 10^9$	$1.77 \pm 0.13 \times 10^9$	<10	

* Colony forming units (CFU/mL); <10, number of bacteria below the detection limit. Abbreviations: control—control sample (before stress treatment), 200 MPa—directly after exposure to 200 MPa pressure, 400 MPa—directly after exposure to 400 MPa pressure.

3.2. Changes in Antibiotic Resistance Phenotype and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Value

After applying the HPP treatments, the results showed an increase in MIC values compared to the control samples for LIN, FOS, SXT, TET, CIP, and DA, respectively, in: four isolates (66.7%) (increase value from 0.25–16 to 4–8 µg/mL), five isolates (83.3%) (from 2–>256 to 128–>256 µg/mL), three isolates (50.0%) (from <0.0625–0.125 to 0.0625–0.125 µg/mL), six isolates (100.0%) (from <0.125–0.5 to 1–2 µg/mL), five isolates (83.3%) (from 0.125–0.25 to

0.25 µg/mL), and one isolate (16.7%) (from 0.25–2 to 0.25–1 µg/mL), after applying 200 MPa pressure. Moreover, the values also increased in five isolates (83.3%) (increase value from 0.25–16 to 4–64 µg/mL), four isolates (66.7%) (from 2–>256 to 64–>256 µg/mL), three isolates (50.0%) (from <0.0625–0.125 to 0.0625–0.25 µg/mL), six isolates (100.0%) (from <0.125–0.5 to 1–4 µg/mL), five isolates (83.3%) (from 0.125–0.25 to 1 µg/mL) and two isolates (33.3%) (from 0.25–2 to 0.0625–1.5 µg/mL), after applying 400 MPa pressure.

After restoring optimal growth conditions, all isolates for LIN, four isolates (66.7%) for FOS, two isolates (33.3%) for CIP, and five isolates (83.3%) for DA showed an increase in MIC values compared to values after direct application of 200 MPa pressure. Changes in MIC values for antibiotics of isolates are presented in Figure 1.

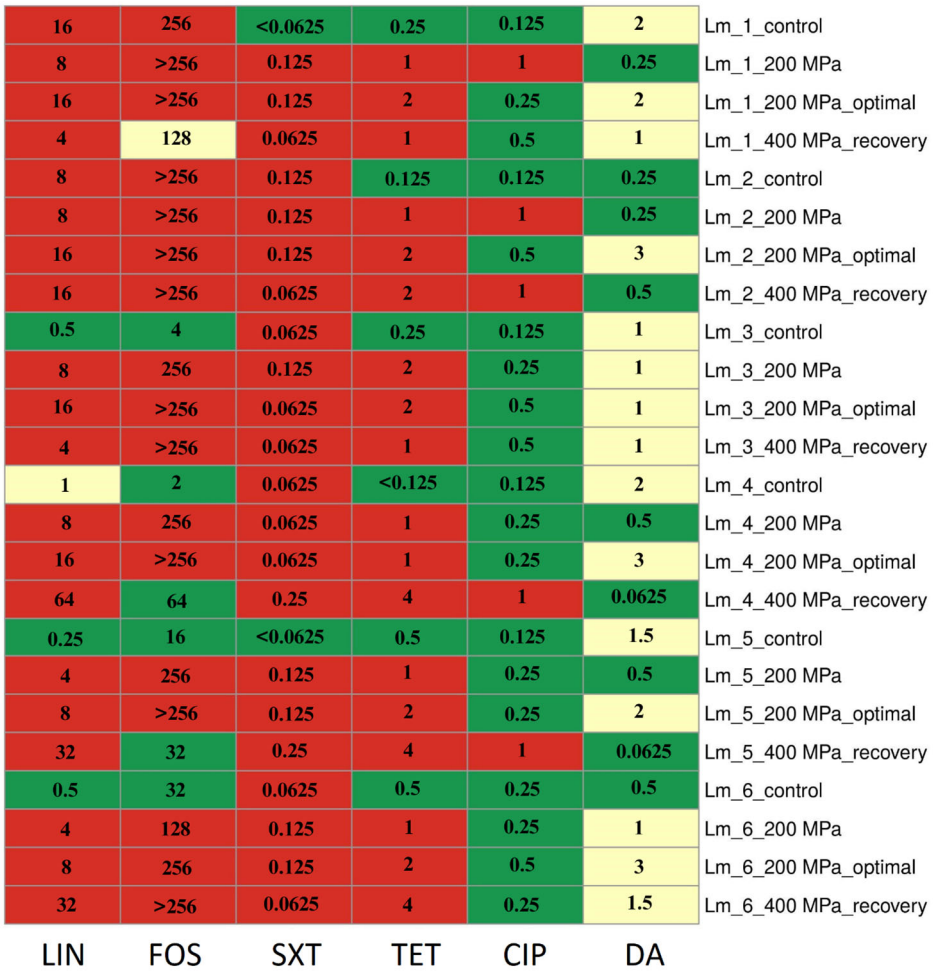


Figure 1. Changes in antibiotic resistance phenotype and MIC (µg/mL) values after HPP treatments. Abbreviation: LIN—lincomycin, FOS—fosfomycin, SXT—trimethoprim/sulfamethoxazole, TET—tetracycline, CIP—ciprofloxacin, DA—clindamycin; control—control sample (before stress treatment); optimal—optimal growth conditions (the isolates were cultured into media with optimal composition and incubated under optimal conditions); recovery—recovered isolates (after exposure to 400 MPa pressure); green—susceptible, yellow—intermediate resistant, red—resistant.

For all isolates initially exhibiting sensitivity to LIN and FOS (n = 4, 66.7%), SXT (n = 2, 33.3%), and TET (n = 6, 100.0%), there was an increase in MIC values, leading to a shift in resistance classification (to resistant). It is noteworthy that the application of each pressure variant, as well as the restoration of optimal growth conditions, increased the MIC values for TET. These changes were observed following the application of 200 MPa pressure and after the cells' recovery from the application of 400 MPa pressure. Importantly, these changes persisted even after the restoration of optimal conditions (following the application of 200 MPa pressure) (Figure 1).

3.3. Changes in Gene Expression

In the present study, the expression of virulence-associated genes (LIPI-1) and antibiotic resistance genes among *L. monocytogenes* isolates was analyzed. The relative expressions of genes among the tested isolates are shown in Figure 2.

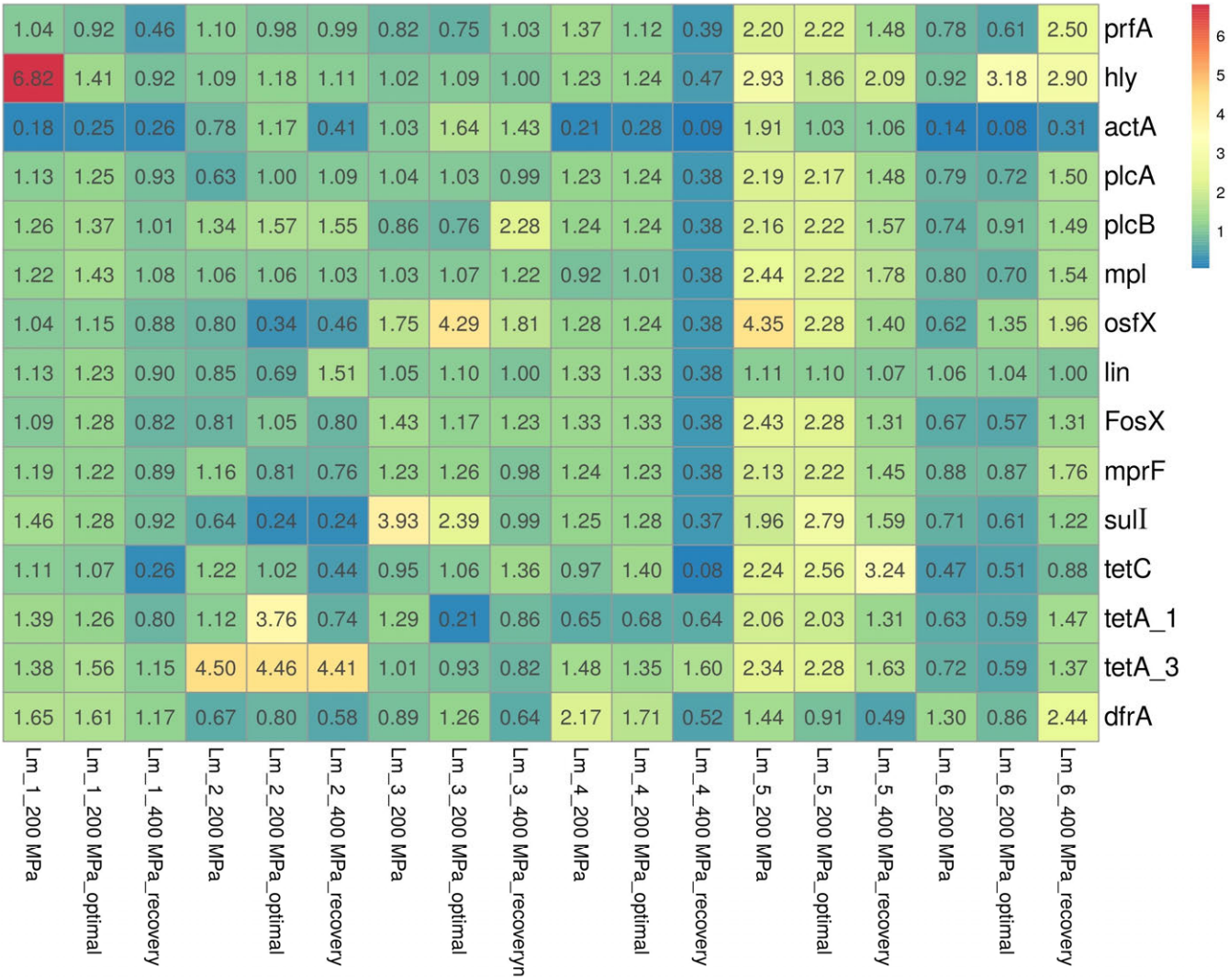


Figure 2. Heatmap of changes in the relative expression levels of the virulence and antibiotic resistance genes in response to HPP treatments. Abbreviation: optimal—optimal growth conditions (the isolates were cultured into media with optimal composition and incubated under optimal conditions); recovery—recovered isolates (after exposure to 400 MPa pressure). Results were visualized using the ClustVis visualizing tool [22].

Regarding genes directly associated with virulence (LIPI-1), mainly slight decreases/increases in the relative expression levels of genes were observed, with levels ranging from 0.62 to 1.75, from 0.61 to 1.86, and from 0.88 to 1.96, respectively, for isolates after the application of 200 MPa pressure, after the restoration of optimal conditions (following the application of 200 MPa pressure), and after the application of 400 MPa pressure. Significant underexpression (<0.50) was primarily noted in the *actA* gene, responsible for encoding the major virulence determinant of *L. monocytogenes*, among three isolates (50.0%): Lm_1 (Lm_1_200 MPa (0.18), Lm_1_200 MPa_optimal (0.25), Lm_1_400 MPa_recovery (0.26)); Lm_4 (Lm_4_200 MPa (0.21), Lm_4_200 MPa_optimal (0.28), Lm_4_400 MPa_recovery (0.09)); and Lm_6 (Lm_6_200 MPa (0.14), Lm_6_200 MPa_optimal (0.08), Lm_6_400 MPa_recovery (0.31)). In contrast, overexpression (>2.00) was mainly observed for two genes: *hly* (Lm_1_200 MPa

(6.82), Lm_5_200 MPa (2.93), Lm_6_200 MPa_optimal (3.18), Lm_5_400 MPa_recovery (2.90)) and *osfX* (Lm_5_200 MPa (4.35), Lm_3_200 MPa_optimal (4.29), Lm_5_200 MPa_optimal (2.28)).

In general, the genes encoding antibiotic resistance were characterized by similar expression as under optimal conditions; there was only a slight decrease/increase in the expression of genes for which relative expression ranges of 0.63–1.96 (for isolates after applying 200 MPa pressure), 0.51–1.71 (for isolates after restoring optimal conditions after 200 MPa pressure), and 0.52–1.76 (for isolates after applying 400 MPa). However, significant overexpression was observed mainly for three genes encoding tetracycline resistance: *tetA_1* (Lm_5_200 MPa (2.06), Lm_2_200 MPa_optimal (3.76), Lm_5_200 MPa_optimal (2.03)); *tetA_3* (Lm_2_200 MPa (4.50), Lm_5_200 MPa (2.28), Lm_2_200 MPa_optimal (4.46), Lm_5_200 MPa_optimal (2.28), and Lm_2_400 MPa_recovery (4.41)); and *tetC* (Lm_5_200 MPa (2.24), Lm_5_200 MPa_optimal (2.56), Lm_5_400 MPa_recovery (3.24)), with underexpression observed for the *tetC* gene (Lm_6_200 MPa (0.47), Lm_1_400 MPa_recovery (0.26), Lm_2_400 MPa_recovery (0.44), and Lm_4_400 MPa_recovery (0.08)).

In general, it was found that the expression of specific genes depended on the isolate. In the case of isolate Lm_5, there was significant overexpression after application of 200 MPa pressure for six of the seven virulence genes analyzed, i.e., *prfA*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *mpl*, and *osfX* (relative expression level 2.16–2.93) and five of the eight antibiotic resistance genes, i.e., *FosX*, *mprF*, *tetC*, *tetA_1*, and *tetA_3* (2.06–4.35), with overexpression persisting even after optimal conditions were restored. Significant underexpression of eleven of the fourteen genes analyzed, i.e., all the LIPI-1 genes (expression ranged from 0.09 to 0.47) and five antibiotic resistance genes, i.e., *osfX*, *lin*, *FosX*, *mprF*, *sulI*, and *tetC* (expression ranged from 0.08 to 0.38) was also observed after applying 400 MPa pressure to the Lm_4 isolate.

3.4. Changes in Biofilm and Slime Production Abilities

After applying the HPP treatments, an increase in biofilm production ability was observed in all the analyzed isolates, regardless of the pressure parameter value or their initial biofilm production ability/inability. These changes persisted after the restoration of optimal environmental conditions.

As regards the slime production capacity, the production of slime was only observed for three isolates (50.0%) following the application of a pressure of 200 MPa, with the isolates initially lacking this ability. These changes did not persist once optimal conditions were restored. Changes in biofilm and slime production abilities are summarized in Table 3.

Table 3. Changes in biofilm and slime production abilities after HPP treatments.

	Biofilm				**Slime Production**			
	Control	**200 MPa**	**200 MPa_Optimal**	**400 MPa_Recovery**	**Control**	**200 MPa**	**200 MPa_Optimal**	**400 MPa_Recovery**
Lm_1	Strong	Strong	Strong	Strong	No	Yes	No	No
Lm_2	Weak					Yes		
Lm_3	Weak					Yes		
Lm_4	No					No		
Lm_5	Moderate					No		
Lm_6	No					No		

Abbreviation: control—control sample (before stress treatment), optimal—optimal growth conditions (the isolates were cultured into media with optimal composition and incubated under optimal conditions), recovery—recovered isolates (after exposure to 400 MPa pressure).

4. Discussion

In recent years, the identification and characterization of isolates under environmental stress caused by food processing has been a major research topic [6,23,24]. During food processing, microorganisms experience various environmental conditions unfavorable to their growth, including low and high temperatures, pH, osmotic stress, disinfectants,

or high pressures [25]. High pressures as a method for food preservation are gaining in popularity, which is why research has been focusing on assessing their effectiveness. There is also an increase in the number of studies on analyses relating to the cellular responses of microflora that have been intentionally added or can survive the process [21,26]. However, comprehensive studies on the cellular responses of pathogens such as *L. monocytogenes* after high-pressure processing are lacking.

High-pressure processing uses different variants of combinations of mainly three factors: pressure (100–600 MPa), time (from a few to several minutes), and temperature (>23 °C) [27]. The high-pressure process parameters are primarily determined by the product type, based on which the appropriate values of the three HPP parameters are selected. The type of product determines, to a large extent, the possibilities associated with the development of a specific microflora (including pathogenic microflora) [28]. Environmental stress induced by HPP contributes to changes in the microorganism cell structure and the cell genome. Consequently, this contributes to changes in cell pathogenicity, including an increase in virulence and antibiotic resistance, which is linked to an increase/decrease in the expression of the genes responsible for their encoding [26]. The extent of the induced changes is dependent on the HPP parameters [29]. Some changes induced by HPP may not be permanent, and the initial reduction in population may be temporary. Cell regeneration can occur during the storage of food products, which is particularly important for pathogenic microflora [30]. Also, sublethal doses of stress factors during preservation (too low a pressure/too short process duration) may affect the activation of mechanisms responsible for an increase in the antibiotic resistance of isolates, the acquisition of cross-resistance, or the adaptation to environmental stress [31].

L. monocytogenes can tolerate a wide variety of adverse environmental conditions occurring during food production [32]. The literature data indicate that the susceptibility of *L. monocytogenes* to HPP is determined by a combination of several factors, i.e., the cell growth phase, individual isolate characteristics, and, primarily, a combination of the conditions under which HPP is carried out [33]. A significant, varying survival rate of different phenotypes and genotypes of *L. monocytogenes* isolates subjected to different HPP variants has been observed [34]. In the current study, two pressure values were selected for HPP (200 and 400 MPa over 5 min) based on the literature data, preliminary research, and the potential for industrial applications. The lower pressure variant did not significantly reduce the population of *L. monocytogenes* in any of the test isolates, which is consistent with the previously conducted studies [26,35–37]. The second pressure variant ensured that the *L. monocytogenes* population was reduced below the level of detection by the plate count method. However, cell regeneration was observed after storage at a temperature of 30 °C. In several previous studies, no presence was noted of culturable *L. monocytogenes* cells immediately after 400 MPa pressurization, while after storage (for up to as many as 42 days) in different (even refrigerated) temperatures, cell recovery was noted in both the food and the microbial culture medium [18,38,39]. The literature reports that cell recovery is determined by several factors, i.e., the process duration and temperature, the individual characteristics of the isolate, and the food matrix. [34–37]. The recovery ability is also explained by the ability of pressurized *L. monocytogenes* cells to transition into a viable but non-culturable (VBNC) state [30]. Such damaged cells can repair the structural changes once optimal environmental conditions are restored during storage at a temperature lower than the optimum growth temperature of these bacteria (especially at the temperatures at which HPP-preserved foods are stored) [40]. The available studies suggest that the ability to adapt to the encountered stress factors may contribute to the ability to survive in one adverse environment while leading to cross-contamination of food products [41].

Microorganisms, particularly pathogens, have various stress response mechanisms that are essential for survival in an adverse food processing environment [42]. *L. monocytogenes* have numerous virulence factors that affect adhesion, binding, and invasion during infection [43]. The genes that are part of Listeria pathogenicity island-1 (LIPI-1) are among the main factors responsible for the pathogenicity of *L. monocytogenes* [44]. The current

study found the presence of all the analyzed genes (*plcA*, *mpl*, *actA*, *plcB*, and *osfX*), which are part of LIPI-1, among all the analyzed *L. monocytogenes* isolates (each of the analyzed isolates contained all the LIPI-1 genes). Furthermore, the current study focused on assessing the effect of high-pressure processing on changes in the expression of these genes and changes within the phenotype of biofilm formation and slime production. The study results indicated possibilities associated with the transient acquisition of slime production ability (for a pressure of 200 MPa), which was lost when optimal conditions were restored, and an increase in the biofilm formation strength, independently from the pressure parameters or the initial strength of its formation (even after the restoration of optimal conditions). The literature reports that biofilm formation ability increases under the influence of HPP [35,45]. The current study is the first to show the potential for increasing the strength of biofilm formation, which is a persistent feature.

Our research indicates overexpression (relative expression >2.0) primarily of two genes, *hly*, encoding listeriolysin O (LLO) (a toxin that forms pores, enabling *L. monocytogenes* to escape from host cell phagosomes and undergo intracellular replication [46]) and *osfX* (a virulence factor that dampens the oxidative response of infected macrophages) [47]. Underexpression was mainly observed in the *actA* gene (actin assembly-inducing protein) [44]. The available literature on changes in virulence gene expression in *L. monocytogenes* under the influence of HPP has only focused on a few genes, including overexpression of *plcA* and *hly* genes, as well as suppression of *sigB* and *prfA* gene expression, depending on the isolate [48]. Our research is the first to focus on analyzing the expression of all LIPI-1 genes under the influence of various HPP variants. Our results confirm that the transcription of virulence genes under the influence of HPP is isolate specific, dependent on HPP conditions, and persists after the restoration of optimal conditions and cell cultivability.

Many different classes of antibiotics are used in the treatment of listeriosis in humans, among which gentamicin, amoxicillin, and penicillin are the first-line antibiotics. In the case of pregnant women, treatment involves the use of erythromycin, vancomycin, and trimethoprim/sulfamethoxazole [49]. Listeriosis can also be treated with other antibiotics, including tetracycline, rifampicin, or fluoroquinolones [50]. In our study, we determined resistance and HPP-mediated changes in resistance to six antibiotics, as well as the expression of genes encoding these resistances. It was observed that the HPP treatments increased antibiotic resistance (associated with an increase in MIC values) in isolates initially showing susceptibility to four of them (lincomycin, fosfomycin, trimethoprim/sulfamethoxazole, and tetracycline). Our research also demonstrated that the expression of specific antibiotic resistance genes is likely determined by individual isolate characteristics, the type of treatment, and the time following treatment.

The observed change in the classification of resistance among all the analyzed *L. monocytogenes* isolates for tetracycline as a result of an increase in the MIC value may be related to the significant overexpression of the three analyzed genes encoding resistance to this antibiotic, namely *tetA_1*, *tetA_3,* and *tetC*. There are currently few studies on HPP's impact on antibiotic resistance changes. There have been reports of increased tetracycline resistance under the influence of this technology among lactic acid bacteria; exposure to HPP affected the expression of the gene encoding resistance to this antibiotic, yet differences were observed between isolates [51,52]. A study conducted by Duru et al. (2020) [10] analyzed the effect of HPP on antibiotic resistance genes *(FosX*, *mprF*, *norB*, and *lin)* also demonstrated differences in the expression of particular antibiotic resistance genes, resulting from individual isolate characteristics and the time after pressure treatment, and also from differences in the amino acid sequence of genes encoding resistance to a specific antibiotic among individual isolates.

The literature reports variability related to individual strains affecting the effectiveness of HPP treatments [53]. Perez-Baltar et al. (2021) [53] examined the survival of two selected strains of *L. monocytogenes* after exposure to HPP in dry-cured ham and during refrigerated storage. The strains, S2 and S7-2, exhibited moderate resistance to HPP (after 450 MPa/10 min, a reduction of 0.8 log CFU/g and after 600 MPa/5 min, reductions of 1.3

and 1.5 log CFU/g, respectively) in low water activity (aw = 0.88) sliced dry-cured ham. Bruschi et al., (2017) [11] used 14 strains of *L. monocytogenes* isolated from food and clinical sources, with different phenotypic and genotypic characteristics. They also observed high intra-strain variability in pressure resistance among the tested strains. In general, all strains were able to survive the 300, 400, and 500 MPa pressure treatments, with loss of viability (in log cycles) ranging from 0.00 to 2.76, from 0.06 to 6.31, and from 0.75 to 7.23, respectively. The application of 500 MPa pressure was enough to reduce the viability of all strains by more than 5 log cycles except for one strain isolated from fermented sausage (reduction <1.00 log CFU/g). The researchers also observed that antibiotic-resistant strains of *L. monocytogenes* showed a higher level of survival after applying 400 MPa pressure [11]. In this study, the application of a pressure of 200 MPa/5 min had no effect on reducing the number of microorganisms; however, a pressure of 400 MPa/5 min had the effect of reducing the number below the detection level for all strains. The increased antibiotic resistance of these strains did not increase their resistance to HPP as in the previous study [11]. Our study also observed marked variability among the isolates in the expression of virulence and antibiotic resistance-related genes and confirmed previous observations, i.e., the way the genes are expressed is a process that may not only significantly vary among different strains of the same bacterial species [54,55]. In addition, studies have reported that gene expression (transcription) was not always correlated with protein synthesis results (translation) for genes involved in biofilm formation in *L. monocytogenes* [56]. Toliopoulos and Giaouris (2023) [55] reported that the strain-related effect of a variation in biofilm gene expression should partly explain the conflicting observations that have sometimes been reported in the literature. In our opinion, strain variability may also influence differences in the expression of other genes encoding virulence and antibiotic resistance among different *L. monocytogenes* isolates. Understanding the links among these characteristics and the differences in antibiotic resistance and gene expression among individual isolates should be a topic for further research consideration, and the results obtained in the current study indicate the need to control changes in antibiotic resistance of pathogens isolated from food under high-pressure processing.

5. Conclusions

Food processing stress changes the virulence and antibiotic resistance of pathogens isolated from food. The results of this study enabled verification of the applied HPP treatment parameters in relation to survivability, virulence potential, and antibiotic resistance of *L. monocytogenes* isolates. In addition, the results pointed to the possibilities associated with the recovery of cells of this pathogen during storage and with changes in the expression of genes involved in virulence and antibiotic resistance. The possibility of retaining cellular activity after recovery and after restoration of optimal environmental conditions may directly impact the spread of highly virulent isolates exhibiting increased antibiotic resistance in the food and food processing environments. The results indicate the need for further analysis of the impact of HPP on the virulence and antibiotic resistance of pathogens isolated from food and food processing environments.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/foods12213899/s1, Table S1: Primers used in the study.

Author Contributions: Conceptualization, P.W., W.C.-W. and A.Z.; methodology, P.W., W.C.-W. and A.Z.; formal analysis, P.W.; investigation, P.W.; resources, A.Z.; writing—original draft preparation, P.W.; writing—review and editing, W.C.-W. and A.Z.; visualization, P.W.; supervision, W.C.-W. and A.Z.; funding acquisition, A.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded in whole by the National Science Centre (Poland) project number 2018/29/B/NZ9/00645 (OPUS-15).

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in this article and Supplementary Materials.

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

References

1. Wideman, N.E.; Oliver, J.D.; Crandall, P.G.; Jarvis, A.N. Detection and potential virulence of viable but non-culturable (VBNC) *Listeria monocytogenes*: A review. *Microorganisms* **2021**, *9*, 194. [CrossRef] [PubMed]
2. Orsi, R.H.; den Bakker, H.C.; Wiedmann, M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int. J. Med. Microbiol.* **2011**, *301*, 79–96. [CrossRef] [PubMed]
3. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Listeriosis Annual Epidemiological Report for 2021 Key Facts. 2022. Available online: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER%20listeriosis%20-%202021.pdf (accessed on 28 August 2023).
4. European Food Safety Authority (EFSA); European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA J.* 2022. Available online: https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/7666 (accessed on 3 July 2023).
5. Lungu, B.; Ricke, S.C.; Johnson, M.G. Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions. *Anaerobe* **2009**, *15*, 7–17. [CrossRef] [PubMed]
6. Wiktorczyk-Kapischke, N.; Wałecka-Zacharska, E.; Skowron, K.; Kijewska, A.; Bernaciak, Z.; Bauza-Kaszewska, J.; Kraszewska, Z.; Gospodarek-Komkowska, E. Comparison of selected phenotypic features of persistent and sporadic strains of *Listeria monocytogenes* sampled from fish processing plants. *Foods* **2022**, *11*, 1492. [CrossRef] [PubMed]
7. Commission Regulation (EC). No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **2005**, *38*, 1–29.
8. Wu, D.; Forghani, F.; Daliri, B.M.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]
9. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ Panel); Koutsoumanis, K.; Alvarez-Ordóñez, A.; Bolton, D.; Bover-Cid, S.; Chemaly, M.; Davies, R.; De Cesare, A.; Herman, L.; Hilbert, F.; et al. Scientific Opinion on the efficacy and safety of high-pressure processing of food. *EFSA J.* **2022**, *20*, 7128–7195. [CrossRef]
10. Duru, I.C.; Andreevskaya, M.; Laine, P.; Rode, T.M.; Ylinen, A.; Løvdal, T.; Bar, N.; Crauwels, P.; Riedel, C.U.; Bucur, F.I.; et al. Genomic characterization of the most barotolerant *Listeria monocytogenes* RO15 strain compared to reference strains used to evaluate food high-pressure processing. *BMC Genom.* **2020**, *21*, 455. [CrossRef]
11. Bruschi, C.; Komora, N.; Castro, S.M.; Saraiva, J.; Ferreira, V.B.; Teixeira, P. High hydrostatic pressure effects on *Listeria monocytogenes* and L. *innocua*: Evidence for variability in inactivation behaviour and in resistance to pediocin bacHA-6111-2. *Food Microbiol.* **2017**, *64*, 226–231. [CrossRef]
12. Wiśniewski, P.; Zakrzewski, A.J.; Zadernowska, A. Antimicrobial resistance and virulence characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environments. *Pathogens* **2022**, *11*, 1099. [CrossRef]
13. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 12.0. Available online: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (accessed on 28 June 2023).
14. *ISO 20776-1*; Susceptibility Testing of Infectious Agents and Evaluation of The Performance of Antimicrobial Susceptibility Test Devices. ISO: Geneva, Switzerland, 2007.
15. Gajewska, J.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A. Occurrence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains along the production chain of raw milk cheeses in Poland. *Molecules* **2022**, *27*, 6569. [CrossRef] [PubMed]
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 30th Informational Supplement*; CLSI Document M100; CLSI: Wayne, PA, USA, 2020.
17. Zakrzewski, A.; Gajewska, J.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A. Effect of sous-vide processing of fish on the virulence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes*. *NFS J.* **2023**, *31*, 155–161. [CrossRef]
18. Valdramidis, V.P.; Patterson, M.F.; Linton, M. Modelling the recovery of *Listeria monocytogenes* in high pressure processed simulated cured meat. *Food Control* **2015**, *47*, 353–358. [CrossRef]
19. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 45. [CrossRef] [PubMed]
20. Stepanović, S.; Vukovic, D.; Hola, V.; Di Bonaventura, G.; Djukic, S.; Ruzicka, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: An overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by Staphylococci. *Apmis* **2007**, *115*, 891–900. [CrossRef]
21. Zarzecka, U.; Zadernowska, A.; Chajęcka-Wierzchowska, W. Effects of osmotic and high-pressure stress on the expression of virulence factors among *Enterococcus* spp. isolated from food of animal origin. *Food Microbiol.* **2022**, *102*, 103900. [CrossRef]
22. Metsalu, T.; Vilo, J. ClustVis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using principal component analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 566–570. [CrossRef]
23. Costa, A.; Bertolotti, L.; Brito, L.; Civera, T. Biofilm formation and disinfectant susceptibility of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* isolates from gorgonzola cheese processing plants. *Foodborne Pathog. Dis.* **2016**, *13*, 602–609. [CrossRef]

24. Fox, E.M.; Leonard, N.; Jordan, K. Physiological and transcriptional characterization of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 6559–6569. [CrossRef]
25. Komora, N.; Bruschi, C.; Magalhães, R.; Ferreira, V.; Teixeira, P. Survival of *Listeria monocytogenes* with different antibiotic resistance patterns to food-associated stresses. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *245*, 79–87. [CrossRef]
26. Duru, I.C.; Bucur, F.I.; Andreevskaya, M. High-pressure processing-induced transcriptome response during recovery of *Listeria monocytogenes*. *BMC Genom.* **2021**, *22*, 117. [CrossRef] [PubMed]
27. Muntean, M.V.; Marian, O.; Barbieru, V.; Cătunescu, G.M.; Ranta, O.; Drocas, I. High pressure processing in food industry—Characteristics and applications. *Agric. Agric. Sci. Procedia* **2016**, *10*, 377–383. [CrossRef]
28. Sehrawat, R.; Kaur, B.P.; Nema, P.K.; Tewari, S.; Kumar, L. Microbial inactivation by high pressure processing: Principle, mechanism and factors responsible. *Food Sci. Biotechnol.* **2020**, *30*, 19–35. [CrossRef] [PubMed]
29. Ferreira, M.; Almeida, A.; Delgadillo, I.; Saraiva, J.; Cunha, Â. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* to high pressure processing: A review. *Food Rev. Int.* **2016**, *32*, 377–399. [CrossRef]
30. Bozoglu, F.; Alpas, H.; Kaletunç, G. Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2004**, *40*, 243–247. [CrossRef]
31. Faezi-Ghasemi, M.; Kazemi, S. Effect of sub-lethal environmental stresses on the cell survival and antibacterial susceptibility of Listeria monocytogenes PTCC1297. *Zahedan J. Res. Med. Sci.* **2015**, *17*, e1915.
32. Buchanan, R.L.; Gorris, L.G.M.; Hayman, M.M.; Jackson, T.C.; Whiting, R.C. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control* **2017**, *75*, 1–13. [CrossRef]
33. Park, E.; Ha, J.; Oh, H.; Kim, S.; Choi, Y.; Lee, Y.; Kim, Y.; Seo, Y.; Kang, J.; Yoon, Y. High prevalence of *Listeria monocytogenes* in smoked duck: Antibiotic and heat resistance, virulence, and genetics of the isolates. *Food Sci. Anim. Resour.* **2021**, *41*, 324–334. [CrossRef]
34. Evert-Arriagada, K.; Trujillo, A.; Amador-Espejo, G.; Hernández-Herrero, M. High pressure processing effect on different *Listeria* spp. in a commercial starter-free fresh cheese. *Food Microbiol.* **2018**, *76*, 481–486. [CrossRef]
35. Ritz, M.; Tholozan, J.L.; Federighi, M.; Pilet, M.F. Morphological and physiological characterization of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 2240–2247. [CrossRef]
36. Chen, Y.A.; Chen, G.-W.; Ku, H.H.; Huang, T.C.; Chang, H.Y.; Wei, C.I.; Tsai, Y.H.; Chen, T.Y. Differential proteomic analysis of *Listeria monocytogenes* during high-pressure processing. *Biology* **2022**, *11*, 1152. [CrossRef] [PubMed]
37. Misiou, O.; van Nassau, T.J.; Lenz, C.A.; Vogel, R.F. The preservation of Listeria-critical foods by a combination of endolysin and high hydrostatic pressure. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, *266*, 355–362. [CrossRef]
38. Tomasula, P.M.; Renye, J.A.; Van Hekken, D.L.; Tunick, M.H.; Kwoczak, R.; Toht, M.; Leggett, L.N.; Luchansky, J.B.; Porto- Fett, A.C.; Phillips, J.G. Effect of high-pressure processing on reduction of *Listeria monocytogenes* in packaged queso fresco. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 1281–1295. [CrossRef] [PubMed]
39. Jofré, A.; Aymerich, T.; Bover-Cid, S.; Garriga, M. Inactivation and recovery of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* after high hydrostatic pressure treatments up to 900 MPa. *Int. Microbiol.* **2010**, *3*, 105–112. [CrossRef]
40. Nakaura, Y.; Morimatsu, K.; Inaoka, T.; Yamamoto, K. *Listeria monocytogenes* cells injured by high hydrostatic pressure and their recovery in nutrient-rich or -free medium during cold storage. *High Press Res.* **2019**, *39*, 324–333. [CrossRef]
41. Morvan, A.; Moubareck, C.; Leclercq, A.; Hervé-Bazin, M.; Bremont, S.; Lecuit, M.; Courvalin, P.; Le Monnier, A. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 2728–2731. [CrossRef]
42. Sibanda, T.; Buys, E.M. *Listeria monocytogenes* Pathogenesis: The role of stress adaptation. *Microorganisms* **2022**, *10*, 1522. [CrossRef]
43. Ghosh, P.; Higgins, D.E. *Listeria monocytogenes* Infection of the Brain. *J. Vis. Exp.* **2018**, *140*, 58723. [CrossRef]
44. Quereda, J.J.; Morón-García, A.; Palacios-Gorba, C.; Dessaux, C.; Pucciarelli, M.G.; Ortega, A.D. Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes*: A trip from environmental to medical microbiology. *Virulence* **2021**, *12*, 2509–2545. [CrossRef]
45. Bonsaglia, E.; Silva, N.; Fernades Júnior, A.; Araújo Júnior, J.; Tsunemi, M.; Rall, V. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control* **2014**, *35*, 386–391. [CrossRef]
46. Hamon, M.A.; Ribet, D.; Stavru, F.; Cossart, P. Listeriolysin O: The Swiss army knife of *Listeria*. *Trends Microbiol.* **2012**, *20*, 360–368. [CrossRef] [PubMed]
47. Prokop, A.; Gouin, E.; Villiers, V.; Nahori, M.A.; Vincentelli, R.; Duval, M.; Cossart, P.; Dussurget, O. OrfX, a Nucleomodulin Required for *Listeria monocytogenes* Virulence. *mBio.* **2017**, *8*, e01550-17. [CrossRef] [PubMed]
48. Pérez-Baltar, A.; Alía, A.; Rodríguez, A.; Córdoba, J.J.; Medina, M.; Montiel, R. Impact of water activity on the inactivation and gene expression of *Listeria monocytogenes* during refrigerated storage of pressurized dry-cured ham. *Foods* **2020**, *9*, 1092. [CrossRef] [PubMed]
49. Wang, X.M.; Lu, X.F.; Yin, L.; Liu, H.F.; Zhang, W.J.; Si, W. Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from retail raw foods. *Food Control.* **2013**, *32*, 153–158. [CrossRef]
50. Olaimat, A.N.; Al-Holy, M.A.; Shahbaz, H.M.; Al-Nabulsi, A.A.; Abu Ghoush, M.H.; Osaili, T.M.; Ayyash, M.M.; Holley, R.A. Emergence of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes* isolated from food products: A comprehensive review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2018**, *17*, 1277–1292. [CrossRef]

51. Zarzecka, U.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zakrzewski, A.; Zadernowska, A.; Fraqueza, M.J. High pressure processing, acidic and osmotic stress increased resistance to aminoglycosides and tetracyclines and the frequency of gene transfer among strains from commercial starter and protective cultures. *Food Microbiol.* **2022**, *107*, 104090. [CrossRef]
52. Zarzecka, U.; Zadernowska, A.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Adamski, P. Effect of high-pressure processing on changes in antibiotic resistance genes expression among strains from commercial starter cultures. *Food Microbiol.* **2023**, *110*, 104169. [CrossRef]
53. Pérez-Baltar, A.; Serrano, A.; Medina, M.; Montiel, R. Effect of high pressure processing on the inactivation and the relative gene transcription patterns of *Listeria monocytogenes* in dry-cured ham. *LWT* **2021**, *139*, 110555. [CrossRef]
54. Elowitz, M.B.; Levine, A.J.; Siggia, E.D.; Swain, P.S. Stochastic gene expression in a single cell. *Science* **2002**, *297*, 1183–1186. [CrossRef]
55. Toliopoulos, C.; Giaouris, E. Marked inter-strain heterogeneity in the differential expression of some key stress response and virulence-related genes between planktonic and biofilm cells in *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **2023**, *390*, 110136. [CrossRef]
56. Wang, J.; Wu, G.; Chen, L.; Zhang, W. Integrated analysis of transcriptomic and proteomic datasets reveals information on protein expressivity and factors affecting translational efficiency. *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1375*, 123–136. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Table S1. Primers used in study.

	Primer	Sequence 5'-3'	Annealing temperaturę [°C]	Reference
Virulence associated genes (LIPI-1)	rt-actA-F	ACAACGGTGAGCAAACAGGA	59.0	[1]
	rt-actA-R	CGCTCCACTTGTAGAGTTGGT		
	rt-hly-F	TGCCAGGTAACGCGAGAAAT	58.5	
	rt-hly-R	TGGTGCCCCAGATGGAGATA		
	rt-mpl-F	ATCAAGGTCCACGTCACACC	58.6	this study
	rt-mpl-R	TCCTAAGCTGTCCTTGCTGC		
	rt-mprF-F	GGAAGCAGCGATTGAAGAGG	59.4	
	rt-mprF-R	GGACGTCGACAAAACCTTCC		
	rt-osfX-F	TGTAATCGCGCTATGTTCCGT	59.8	
	rt-osfX-R	ACTCAATCTCCTTTGCATCGC		
	rt-plcA-F	CCCATTAGGCGGGAAAGCAT	59.6	
	rt-plcA-R	TCAGGTAGAGCGGACATCCA		
	rt-plcB-F	AAAAGGGCGAAAGCGGACTA	57.9	
	rt-plcB-R	ACCTGCCAAAGTTTGCTGTG		
	rt-prfA-F	TTAGCGAGAACGGGACCATC	58.2	
	rt-prfA-R	TAACGTATGCGGTAGCCTGC		
Antibiotic resistance genes	rt-dfrA-F	AAGCTGTTTTAGCCCTTGCTG	59.8	[1]
	rt-dfrA-R	GGAAACGCAGTATCAGCCTCA		
	rt-lin-F	AGCGTTCAAACCAAGCAAGT	56.9	
	rt-lin-R	GGAGCATACTGAGCAGCAAC		
	rt-fosX-F	GTGGATGAATATATTGAGCGGATT	56.9	
	rt-fosX-R	CTTCGACTCTGGGACGTTCT		
	rt-sul-F	ATGGTGGAAGATGGAGCAGC	59.0	
	rt-sul-R	TCGGGTAATTTCGTCCTGACA		
	rt-tetA_1-F	GGGCGCTTTGGGTACTCTTT	59.7	
	rt-tetA_1-R	TCCGCTCCTCTTGAGGTGTA		
	rt-tetA_3-F	CGACTGCCAATGCGCTAATC	58.1	
	rt-tetA_3-R	CCAATTAGCACGCCCGAAAC		
	rt-tetC-F	AAAAGAAGCGGACTCGAGCA	58.6	
	rt-tetC-R	AGTGCCGGTTGGGTAATGTT		

[1] Zakrzewski, A.; Gajewska, J.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A. Effect of sous-vide processing of fish on the virulence and antibiotic resistance of Listeria monocytogenes. NFS J. 2023, 31, 155–161. https://doi.org/10.1016/j.nfs.2023.05.003.

Olsztyn, dn. 08.06.2026 r.
(miejscowość, data)

mgr inż. Patryk Wiśniewski
(imię i nazwisko kandydata)
Technologia żywności i żywienia
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE
autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: *High-Pressure Processing – Impacts on the Virulence and Antibiotic Resistance of Listeria monocytogenes Isolated from Food and Food Processing Environments* (Wiśniewski, P., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2023). *High-Pressure Processing – Impacts on the Virulence and Antibiotic Resistance of Listeria monocytogenes Isolated from Food and Food Processing Environments.* Foods, 12, 3899. https://doi.org/10.3390/foods12213899) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich dyskusji na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny).

Wiśniewski Patryk
.....
(podpis kandydata)

Olszty, dn. 08.06.2026 r.
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem *High-Pressure Processing – Impacts on the Virulence and Antibiotic Resistance of Listeria monocytogenes Isolated from Food and Food Processing Environments* (Wiśniewski, P., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2023). *High-Pressure Processing – Impacts on the Virulence and Antibiotic Resistance of Listeria monocytogenes Isolated from Food and Food Processing Environments.* Foods, 12, 3899. https://doi.org/10.3390/foods12213899) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: współtworzeniu koncepcji badań, częściowym zbieraniu danych literaturowych, dokonaniu krytycznej rewizji i redakcji tekstu oraz pełnieniu nadzoru naukowego.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Patryka Wiśniewskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Patryka Wiśniewskiego polegający na: udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich dyskusji na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny).

Wioleta Chajęcka-Wierzchowska
.....
podpis

Olsztyn, dn. 08.06.2026 r.
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Anna Zadernowska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem *High-Pressure Processing – Impacts on the Virulence and Antibiotic Resistance of Listeria monocytogenes Isolated from Food and Food Processing Environments* (Wiśniewski, P., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2023). *High-Pressure Processing – Impacts on the Virulence and Antibiotic Resistance of Listeria monocytogenes Isolated from Food and Food Processing Environments.* Foods, 12, 3899. https://doi.org/10.3390/foods12213899) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: współtworzeniu koncepcji badań, zbieraniu i analizie danych literaturowych, recenzji i redakcji manuskryptu, sprawowaniu nadzoru naukowego nad projektem oraz pozyskaniu finansowania niezbędnego do realizacji badań

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Patryka Wiśniewskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Patryka Wiśniewskiego polegający na: udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich dyskusji na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny).

Anna Zadernowska
podpis

Załącznik nr 3

Publikacja P3

Wiśniewski, P., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2024). High-Pressure Processing Influences Antibiotic Resistance Gene Transfer in *Listeria monocytogenes* Isolated from Food and Processing Environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 25, 12964. https://doi.org/10.3390/ijms252312964.

MNiSW – 140, IF – 4.9 ; WoS – 5; GS – 8; RG – 6

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

High-Pressure Processing Influences Antibiotic Resistance Gene Transfer in *Listeria monocytogenes* Isolated from Food and Processing Environments

Patryk Wiśniewski, Wioleta Chajęcka-Wierzchowska and Anna Zadernowska *

Department of Food Microbiology, Meat Technology and Chemistry, Faculty of Food Science, University of Warmia and Mazury, Plac Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn, Poland; patryk.wisniewski@uwm.edu.pl (P.W.); wioleta.chajecka@uwm.edu.pl (W.C.-W.)
* Correspondence: anna.zadernowska@uwm.edu.pl

Abstract: The study aimed to assess the high-pressure processing (HPP) impact on antibiotic resistance gene transfer in *L. monocytogenes* from food and food processing environments, both in vitro (in microbiological medium) and in situ (in carrot juice), using the membrane filter method. Survival, recovery, and frequency of antibiotic resistance gene transfer analyses were performed by treating samples with HPP at different pressures (200 MPa and 400 MPa). The results showed that the higher pressure (400 MPa) had a significant effect on increasing the transfer frequency of genes such as *fosX*, encoding fosfomycin resistance, and *tet_A1*, *tet_A3*, *tetC*, responsible for tetracycline resistance, both in vitro and in situ. In contrast, the *Lde* gene (the gene encoding ciprofloxacin resistance) was not transferred under any conditions. In the food matrix (carrot juice), greater variability in results was observed, suggesting that food matrices may have a protective effect on bacteria and modify HPP efficacy. In general, an increase in MIC values for antibiotics was noted in transconjugants compared to donors. Genotypic analysis of transconjugants showed differences in genetic structure, especially after exposure to 400 MPa pressure, indicating genotypic changes induced by pressure stress. The study confirms the possibility of antibiotic resistance genes transfer in the food environment, even from strains showing initial susceptibility to antibiotics carrying so-called silent antibiotic resistance genes, highlighting the public health risk of the potential spread of antibiotic-resistant strains through the food chain. The findings suggest that high-pressure processing can increase and decrease the frequency of resistance gene transfer depending on the strain, antibiotic combination, and processing conditions.

Keywords: antibiotic resistance genes; genes transfer; high-pressure processing

check for updates

Citation: Wiśniewski, P.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A. High-Pressure Processing Influences Antibiotic Resistance Gene Transfer in *Listeria monocytogenes* Isolated from Food and Processing Environments. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 12964. https://doi.org/10.3390/ijms252312964

Academic Editors: Francesca Micoli and Aleksandra Królicka

Received: 2 November 2024
Revised: 27 November 2024
Accepted: 29 November 2024
Published: 2 December 2024

Copyright: © 2024 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

The growing concern over antibiotic resistance among foodborne pathogens is a critical public health issue. *Listeria monocytogenes*, the bacterium responsible for causing listeriosis, is particularly worrying due to its high mortality rate and ability to survive in harsh food processing environments. *L. monocytogenes* is exceptionally resilient to harsh environmental conditions, making it particularly challenging in the food industry. Although HPP effectively eliminates many microorganisms, *L. monocytogenes* shows resistance under certain conditions, especially in the presence of biofilms or when previously exposed to sublethal environmental stresses [1]. Additionally, *L. monocytogenes* can enter the food chain through contaminated soil, water, and processing equipment, leading to contamination of fresh produce, such as vegetables used in juices, and ready-to-eat food products [2]. Contamination of the food chain by *L. monocytogenes* poses a significant challenge for the industry, requiring not only stringent hygiene protocols but also improved control strategies to reduce the risk of infections [3].

The emergence of antibiotic-resistant strains of *L. monocytogenes* exacerbates this threat, complicating infection treatment, particularly in susceptible populations, such as pregnant women, the elderly, and the immunocompromised [4,5]. *L. monocytogenes* is also characterized by its ability to resist multiple antibiotics, further complicating its control and treatment of infection [6]. Listeriosis has a high mortality rate, especially in immunocompromised individuals. According to the European Food Safety Authority (EFSA), *L. monocytogenes* caused the highest rates of hospitalization and mortality among zoonotic diseases in Europe, with a reported incidence of 0.44 cases per 100,000 people in 2021 and 1.7 cases per 100,000 people over the age of 64 [7]. The increasing frequency of zoonotic outbreaks and the persistence of resistant strains underscore the urgent need for comprehensive monitoring and improved food safety measures throughout the production chain.

Antibiotic resistance in *L. monocytogenes* is mainly due to horizontal gene transfer (HGT), which allows the bacteria to acquire genetic material from other microorganisms in the host environment. This process is a major factor in spreading antibiotic resistance in natural environments and the food industry [7]. The transfer of antibiotic resistance genes (ARGs) in *L. monocytogenes* strains is observed in various studies [5–8]. *L. monocytogenes* has been shown to acquire resistance through plasmids and transposons that can be transferred between different bacterial species, including those found in food products and the human microflora [5,9].

Interestingly, resistance gene transfer is not limited to intra-species exchange but also occurs between different microorganisms, such as *Enterococcus faecalis* to *L. monocytogenes* [5,10]. Recent studies have shown that *L. monocytogenes* can acquire resistance genes from other bacteria, such as *E. faecium*, often found in fermented meat products [5]. The transfer of tetracycline resistance via conjugation with enterococci highlights the potential for spreading resistance genes in the food environment [5]. Furthermore, studies have also shown that resistance genes can be transferred between bacteria in vitro and in vivo, posing a significant challenge to public health and food safety [11]. Moreover, the presence of resistance genes in *Listeria* strains isolated from food and clinical samples indicates the potential for these genes to spread through the food chain, posing a risk to the effective treatment of listeriosis [12–15].

Of particular concern in the food processing context is that high-pressure processing (HPP) can potentially affect the activation and expression of resistance genes, increasing the risk of their further spread [16]. In recent years, HPP has gained popularity as a non-thermal method of food preservation, capable of inactivating pathogens while maintaining the sensory and nutritional quality of food products [4]. The HPP involves the application of high pressure (100–600 MPa) for several minutes at room temperature or lower, which usually leads to damage to cell structures and subsequent inactivation of the microorganisms. Although HPP is effective in reducing the number of *L. monocytogenes* to below-detectable levels, the effect of this technology on the transfer and expression of antibiotic-resistance genes remains the subject of intensive research [16]. In the context of food safety, HPP is considered an effective method of reducing pathogen abundance to levels that are safe for consumers. However, concerns have been raised regarding the potential recovery of bacterial populations following treatment and the persistence of phenotypic and genotypic changes induced by pressure stress [4]. In addition, research suggests that HPP may lead to a sustained increase in antibiotic resistance, posing additional challenges for the food industry and health systems [16].

Several studies have suggested that HPP treatment may lead to stressed cellular responses in microorganisms that may affect the expression of virulence factors and antibiotic-resistance genes [17–19]. For example, it has been observed that after HPP treatment, the frequency of transfer of certain resistance genes, such as those encoding resistance to tetracyclines, ampicillin, and chloramphenicol, increases both in vitro and in situ in a food matrix in strains form starter cultures [18]. In a study on the effect of HPP on antibiotic-susceptibility, it was observed that some strains of *L. monocytogenes* that were initially susceptible to lincomycin, fosfomycin, trimethoprim/sulfamethoxazole, and tetracycline

became resistant to these antibiotics after HPP treatment. This phenomenon was associated with an increase in minimum inhibitory concentrations (MICs) and increased expression of antibiotic resistance genes, further complicating the management of antibiotic resistance in food processing environments [16]. Studies have shown that *L. monocytogenes* isolates from various sources, including food and clinical settings, often carry multiple resistance genes, contributing to their resistance to antimicrobial treatment [16,20–24]. Furthermore, the prevalence of resistance genes documented in large-scale studies highlights the need for continuous monitoring and understanding of these dynamics [7].

In addition, HPP may also affect resistance gene transfer in the environment. In studies on an in vivo model, which better reflects the actual conditions in living organisms, it was found that the level of resistance gene transfer can be higher than under in vitro laboratory conditions. This indicates the need for more advanced models investigating resistance gene transfer to understand better and control the spread of antibiotic resistance [11]. Research into the impact of HPP on antibiotic resistance gene transfer in *L. monocytogenes* is key to understanding the risks associated with this technology in the food industry. Therefore, the study aimed to assess HPP treatment's impact on antibiotic resistance gene transfer in *L. monocytogenes*, both in vitro and in situ, using isolates from food and food processing environments. The study aimed to understand if and how HPP can affect gene transfer mechanisms, thereby influencing the spread of antibiotic resistance in food-borne pathogens.

2. Results

2.1. Donor Isolates Characterization

At the beginning of the study, all *L. monocytogenes* strains used as donors were tested for plasmid localization of antibiotic-resistance genes. Genes encoding resistance to a particular antibiotic and plasmid-localized were screened for transferability. The characteristics of isolates carrying specific genes on plasmids are presented in Table 1.

Table 1. Plasmid localization of antibiotic resistance genes in analyzed *L. monocytogenes* strains.

	Antibiotic Resistance							
	TET			**LIN**	**CIP**	**FOS**	**DA**	
	tetA_1	***tetA_3***	***tetC***	***lin***	***Lde***	***fosX***	***lnuA***	***mefA***
Lm_1	+	+	+	+	+	+	+	ND
Lm_2	+	+	+	+	+	+	ND	+
Lm_3	+	+	+	+	+	+		ND
Lm_4	+	+	+	+	+	+		
Lm_5	+	+	+	+	+	+		
Lm_6	+	+	+	+	+	+	+	+

Abbreviation: TET—tetracycline, LIN—lincomycin, CIP—ciprofloxacin, FOS—fosfomycin, DA—clindamycin; ND—not detected; +—presence of a gene encoded on the plasmid.

2.2. Survival and Recovery Analysis

The survival analysis was carried out using plate count methods in two experimental variants—in vitro in BHI microbiological medium (Merck, Darmstadt, Germany) and in situ in a food matrix, carrot juice (Vital Fresh, Łęczyca, Poland). As in the authors' previous study [16], the lower pressure variant did not reduce the live cell counts of the individual strains, compared to the initial count regardless of the experimental variant. Higher pressure reduced abundance to below the detection limit (<10 CFU/mL) for isolates analyzed in vitro (Table 2). For isolates pressurized in carrot juice, three isolates (Lm_4, Lm_5, and Lm_6) were detectable using the counting method. The counts of the individual strains were 2×10^1 CFU/mL, 7×10^1 CFU/mL, and 3×10^1 CFU/mL, respectively (Table 3). The remaining strains were subjected to recovery in carrot juice.

Table 2. The viable cell count of *L. monocytogenes* isolates was analyzed in vitro.

	Control *	200 MPa *	400 MPa *	Recovery After 400 MPa
Lm_1	$7.15 \pm 0.22 \times 10^9$	$2.18 \pm 0.15 \times 10^9$	<10	Yes
Lm_2	$2.70 \pm 0.20 \times 10^9$	$1.44 \pm 0.10 \times 10^9$	<10	
Lm_3	$1.91 \pm 0.10 \times 10^9$	$1.64 \pm 0.11 \times 10^9$	<10	
Lm_4	$2.26 \pm 0.21 \times 10^9$	$1.87 \pm 0.25 \times 10^9$	<10	
Lm_5	$2.68 \pm 0.10 \times 10^9$	$1.35 \pm 0.12 \times 10^9$	<10	
Lm_6	$2.08 \pm 0.19 \times 10^9$	$1.77 \pm 0.13 \times 10^9$	<10	

Abbreviation: * colony forming units (CFU/mL); <10—number of bacteria below the detection limit; control—control sample (before stress treatment); 200 MPa—directly after exposure to 200 MPa pressure; 400 MPa—directly after exposure to 400 MPa pressure.

Table 3. The viable cell count of *L. monocytogenes* isolates was analyzed in situ.

	Control *	200 MPa *	400 MPa *	Recovery After 400 MPa
Lm_1	$7.03 \pm 0.12 \times 10^8$	$7.01 \pm 0.10 \times 10^8$	<10	Yes
Lm_2	$7.53 \pm 0.13 \times 10^8$	$7.41 \pm 0.12 \times 10^8$		
Lm_3	$7.84 \pm 0.13 \times 10^8$	$7.78 \pm 0.13 \times 10^8$		
Lm_4	$8.52 \pm 0.02 \times 10^8$	$8.34 \pm 0.22 \times 10^8$	$2.00 \pm 0.10 \times 10^1$	NA
Lm_5	$6.68 \pm 0.18 \times 10^8$	$6.68 \pm 0.13 \times 10^8$	$7.00 \pm 0.20 \times 10^1$	
Lm_6	$6.01 \pm 0.13 \times 10^8$	$5.97 \pm 0.15 \times 10^8$	$3.00 \pm 0.20 \times 10^1$	

Abbreviation: * colony forming units (CFU/mL); <10—number of bacteria below the detection limit; NA—not applicable; control—control sample (before stress treatment); 200 MPa—directly after exposure to 200 MPa pressure; 400 MPa—directly after exposure to 400 MPa pressure.

All strains obtained, both after treatment with 200 MPa (in medium and food matrix) and recovered after treatment with 400 MPa (in medium and food matrix), were immediately subjected to analyses of the possibility of transfer of antibiotic resistance genes.

2.3. Antibiotic Resistance Genes Transfer

2.3.1. Gene Transfer Frequency

Six *L. monocytogenes* strains were used as donors, while *Enterococcus faecalis* strain JH2-2 served as the recipient in in vitro and in situ gene transfer experiments. Tables 4 and S1 present the results of testing the effect of HPP on the frequency of antibiotic resistance gene transfer in the growth medium (in vitro) and the food matrix (in situ) (see Tables S2–S7 for more details).Evaluation of the effect of HPP revealed that its impact varied significantly depending on the applied pressure and the experimental environment. Higher pressure values, particularly 400 MPa, were associated with an increased frequency of gene transfer, especially in the food matrix, while the growth medium demonstrated more stable results.

For tetracycline (TET), a substantial increase in gene transfer frequency was observed in transconjugant TC-Lm_1 after recovery following exposure to 400 MPa in the food matrix, where the value reached $1.51 \pm 0.03 \times 10^2$, compared to the control value of $4.91 \pm 0.07 \times 10^{-1}$. Similarly, increases were noted for TC-Lm_4 ($0.41 \pm 0.02 \times 10^1$) and TC-Lm_6 ($0.52 \pm 0.01 \times 10^1$) in the food matrix following 400 MPa. In contrast, the growth medium exhibited smaller differences, such as in TC-Lm_4, where the frequency reached $3.40 \pm 0.11 \times 10^{-1}$ post-400 MPa, compared to the control value of $1.29 \pm 0.02 \times 10^{-1}$. For lincomycin (LIN), similar patterns were observed. In the food matrix, TC-Lm_1 showed a frequency of $0.18 \pm 0.01 \times 10^1$ after 400 MPa, more than threefold higher than the control value of $4.79 \pm 0.04 \times 10^{-1}$. TC-Lm_4 also demonstrated an increase in the food matrix ($0.19 \pm 0.01 \times 10^1$ post-400 MPa), while the growth medium revealed only modest changes, with values such as $0.10 \pm 0.00 \times 10^1$ for TC-Lm_4, compared to $3.19 \pm 0.03 \times 10^{-1}$ in the control.

Table 4. Results of gene transfer in microbial culture medium (in vitro) and food matrix (in situ) before and after exposure to HPP.

Antibiotic	TC	Microbial Culture Medium (In Vitro)		Food Matrix (In Situ)	
		200 MPa	Recovery After 400 MPa	200 MPa	Recovery After 400 MPa
TET	TC-Lm_1	↓	↑	↓	↑
	TC-Lm_2	↓	↑	↑	↓
	TC-Lm_3	↓	↑	↑	↓
	TC-Lm_4	↑	↑	↓	↑
	TC-Lm_5	↓	↑	↓	↑
	TC-Lm_6	↓	↓	↑	↑
LIN	TC-Lm_1	↑	↑	↓	↑
	TC-Lm_2	↑	↓	↑	↑
	TC-Lm_3	↑	↑	↓	↑
	TC-Lm_4	↓	↑	↑	↑
	TC-Lm_5	↑	↑	↓	↓
	TC-Lm_6	↑	↑	↑	↓
CIP	TC-Lm_1	-	↓	↑	↑
	TC-Lm_2	-	↓	↑	↑
	TC-Lm_3	↓	↑	↑	↑
	TC-Lm_4	↓	↓	↑	↑
	TC-Lm_5	↓	↑	↑	↑
	TC-Lm_6	↑	↑	↑	↑
FOS	TC-Lm_1	↑	↑	↑	↑
	TC-Lm_2	↑	↑	↑	↑
	TC-Lm_3	↑	↑	↓	↓
	TC-Lm_4	↑	↑	↓	↓
	TC-Lm_5	↓	↑	↑	↓
	TC-Lm_6	↑	↓	↓	↓
DA	TC-Lm_1	↓	↑	↓	↓
	TC-Lm_2	↓	↓	↑	↓
	TC-Lm_3	↓	↓	↑	↑
	TC-Lm_4	↑	↓	↓	↑
	TC-Lm_5	↓	↓	↓	↑
	TC-Lm_6	↑	↓	↑	↑

Abbreviations: ↓—a decrease in the frequency of gene transfer compared to the control value; ↑—increase in gene transfer frequency compared to control value; —-no decrease in the frequency of gene transfer compared to the control value; TC—transconjugant; TC/R—transfer rate, TET—tetracycline, LIN—lincomycin, CIP—ciprofloxacin, FOS—fosfomycin, DA—clindamycin; 200 MPa—transconjugant obtained from the strain after exposure to 200 MPa pressure; 400 MPa—transconjugant obtained from the recovered strain after exposure to 400 MPa pressure.

For ciprofloxacin (CIP), an increase in gene transfer frequency was noted in the food matrix after 400 MPa, particularly in TC-Lm_1, where the value soared to $8.51 \pm 0.06 \times 10^{1}$, over twenty times higher than the control ($2.56 \pm 0.03 \times 10^{-1}$). Similarly, TC-Lm_6 displayed a frequency of $5.65 \pm 0.21 \times 10^{2}$, compared to the control value of $1.81 \pm 0.01 \times 10^{-2}$. In the growth medium, changes were less pronounced; for instance, TC-Lm_2 exhibited a frequency of $6.76 \pm 0.30 \times 10^{-1}$ after 400 MPa, compared to the control value of

$0.26 \pm 0.00 \times 10^{1}$. Fosfomycin (FOS) and clindamycin (DA) exhibited smaller increases in the food matrix. For example, TC-Lm_5 showed a frequency of $7.17 \pm 0.18 \times 10^{-1}$ after 400 MPa, slightly higher than the control ($1.46 \pm 0.04 \times 10^{-1}$). For clindamycin, TC-Lm_4 demonstrated a frequency of $0.16 \pm 0.00 \times 10^{1}$ following 400 MPa in the food matrix, compared to the control value of $5.12 \pm 0.04 \times 10^{-1}$.

Conversely, some transconjugants showed decreases in gene transfer frequency after HPP. For TET, TC-Lm_3 displayed a marked reduction in the food matrix, where the frequency dropped to $0.70 \pm 0.02 \times 10^{-1}$ after 400 MPa, compared to the control ($2.30 \pm 0.09 \times 10^{-1}$). In the growth medium, the frequency for TC-Lm_3 decreased to $0.16 \pm 0.00 \times 10^{1}$, compared to the control value of $3.53 \pm 0.03 \times 10^{-1}$. Similarly, TC-Lm_5 in the food matrix exhibited a frequency of $0.13 \pm 0.01 \times 10^{1}$ after 400 MPa, compared to the control ($4.71 \pm 0.07 \times 10^{-1}$). For LIN, decreases were noted in TC-Lm_2 and TC-Lm_3. In the growth medium, TC-Lm_2 showed a frequency of $3.51 \pm 0.07 \times 10^{-1}$ following 400 MPa, compared to $4.01 \pm 0.01 \times 10^{-1}$ in the control, while TC-Lm_3 in the food matrix demonstrated a reduction to $3.38 \pm 0.07 \times 10^{-1}$, compared to $2.17 \pm 0.07 \times 10^{-1}$ in the control.

For CIP, TC-Lm_4 in the growth medium exhibited a decrease in frequency to $1.51 \pm 0.04 \times 10^{-1}$ post-400 MPa, compared to $6.15 \pm 0.05 \times 10^{-1}$ in the control. In TC-Lm_5, the frequency in the food matrix dropped significantly to $5.99 \pm 0.01 \times 10^{1}$ after 400 MPa, compared to the control value of $7.66 \pm 0.03 \times 10^{-2}$. Similar decreases were observed for FOS and DA. For FOS, TC-Lm_3 in the food matrix showed a reduction to $4.87 \pm 0.04 \times 10^{-1}$ following 400 MPa, compared to $0.45 \pm 0.00 \times 10^{1}$ in the control. TC-Lm_4 showed a similar trend, with a frequency of $0.98 \pm 0.02 \times 10^{1}$ after 400 MPa, compared to $5.64 \pm 0.05 \times 10^{-1}$ in the control. For DA, TC-Lm_5 in the growth medium exhibited a frequency of $8.53 \pm 0.19 \times 10^{-1}$ post-400 MPa, compared to $1.92 \pm 0.02 \times 10^{-1}$ in the control. Similarly, TC-Lm_6 in the food matrix showed a reduction to $8.22 \pm 0.05 \times 10^{-1}$, compared to $6.87 \pm 0.05 \times 10^{-1}$ in the control.

These results highlight the complexity of HPP's impact on antibiotic resistance gene transfer frequencies. Depending on the pressure level, environment, and specific transconjugants, HPP at 400 MPa may either enhance or inhibit gene transfer. Statistical analysis (Tables S8–S12) using Friedman's ANOVA, Kruskal–Wallis tests, and Spearman correlation revealed significant differences and relationships between pressure conditions, antibiotic types, and the frequency of resistance gene transfer. Friedman's ANOVA (Table S8) showed notable differences for ciprofloxacin under in situ conditions ($p = 0.002479$), while lincomycin and tetracycline demonstrated trends under varying conditions. Table S9 highlights the impact of pressure on gene transfer, showing significant effects for lincomycin at 200 MPa ($p = 0.036032$) and for ciprofloxacin and fosfomycin after recovery from 400 MPa in situ ($p = 0.036032$). Kruskal–Wallis tests (Table S10) confirmed significant differences in gene transfer frequency among antibiotics after 400 MPa in situ ($p = 0.003999$). Lastly, Spearman correlation analysis (Tables S11 and S12) revealed a strong relationship between HPP and gene transfer frequencies, particularly for fosfomycin at 200 MPa (correlation coefficient 0.787172). These findings underscore the intricate interplay of environmental conditions and pressure levels on the modulation of antibiotic resistance gene transfer during HPP.

2.3.2. Possibility and Confirmation of Gene Transfer

In the transconjugants obtained after gene transfer, the presence of genes encoding antibiotic resistance in both genomic and plasmid DNA was determined (Table 5). The results for tetracycline indicate the possibility of transfer of all three tetracycline resistance genes analyzed (*tet_A1*, *tet_A3*, *tetC*), due to the observed presence of transconjugants in genomic and/or plasmid DNA, with all three genes detected in transconjugants not exposed to HPP and after exposure to 400 MPa in vitro. The *tetC* gene was found in control (in vitro), as well as after exposure to 400 MPa (in vitro). No transfer of this gene was observed in situ indicating that the gene can only be transferred under certain conditions. In the case of lincomycin, only the absence of *lin* gene transfer was observed when higher

HPP process conditions were applied in vitro. In the other conditions analyzed, the *lin* gene was present in both genomic and plasmid DNA independently of the transconjugant. In the case of ciprofloxacin, the resistance gene for this antibiotic (*Lde*) was not found in any of the transconjugants tested, indicating that this gene could not be transferred. The *fosX* gene (encoding fosfomycin resistance) was detected in the plasmid DNA of transconjugants not treated with HPP and after 200 MPa (both in vitro and in situ) in five of the six transconjugants analyzed. The gene was also present in both genomic and plasmid DNA in transconjugants after only 400 MPa treatment in vitro. The potential for transfer of the gene encoding clindamycin resistance (*lnuA*) was also found only in transconjugants not exposed to HPP under both in vitro and in situ conditions—the gene was present in the plasmid DNA of the transconjugants. The *lnuA* gene was not found in transconjugants after exposure to 200 MPa and 400 MPa, indicating the impossibility of gene transfer from the donor to the recipient.

Table 5. Presence of antibiotic resistance genes in transconjugants after gene transfer in microbial culture medium (in vitro) and food matrix (in situ) before and after exposure to HPP.

Antibiotic	TC	Microbial Culture Medium (In Vitro)			Food Matrix (In Situ)		
		Control	200 MPa	Recovery After 400 MPa	Control	200 MPa	Recovery After 400 MPa
TET	TC-Lm_1	*tet_A1*, *tet_A3*, *tetC*	*tet_A1*, *tet_A3* ^{p}	*tet_A1*, *tet_A3*, *tetC*	*tet_A1*, *tet_A3*	*tet_A1*, *tet_A3*	*tet_A1* ^{g}, *tet_A3*
	TC-Lm_2				*tet_A1*, *tet_A3* ^{p}		
	TC-Lm_3		*tet_A1*, *tet_A3*	*tet_A1*, *tet_A3* ^{p}, *tetC*			
	TC-Lm_4	*tet_A1*, *tet_A3*, *tetC* ^{p}		*tet_A1*, *tet_A3*, *tetC*		*tet_A1* ^{p}, *tet_A3*	*tet_A1*, *tet_A3*
	TC-Lm_5	*tet_A1*, *tet_A3*, *tetC*	*tet_A1*, *tet_A3* ^{p}				
	TC-Lm_6	*tet_A1*, *tet_A3*, *tetC* ^{p}				*tet_A1* ^{p}, *tet_A3* ^{p}	
LIN	TC-Lm_1	*lin*	*lin*	-	*lin*	*lin*	*lin*
	TC-Lm_2						
	TC-Lm_3						
	TC-Lm_4						
	TC-Lm_5						
	TC-Lm_6						
CIP	TC-Lm_1	-					
	TC-Lm_2						
	TC-Lm_3						
	TC-Lm_4						
	TC-Lm_5						
	TC-Lm_6						
FOS	TC-Lm_1	*fosX* ^{p}	-	-	*fosX* ^{p}	-	-
	TC-Lm_2		*fosX* ^{p}	*fosX*		*fosX* ^{p}	
	TC-Lm_3		*fosX*				
	TC-Lm_4						
	TC-Lm_5		*fosX* ^{p}				
	TC-Lm_6						
DA	TC-Lm_1	*lnuA* ^{p}	-	-	*lnuA* ^{p}	-	-
	TC-Lm_2	NA					
	TC-Lm_3						
	TC-Lm_4						
	TC-Lm_5						
	TC-Lm_6	*lnuA* ^{p}	-	-	*lnuA* ^{p}	-	-

Abbreviations: TC—transconjugant; TET—tetracycline, LIN—lincomycin, CIP—ciprofloxacin, FOS—fosfomycin, DA—clindamycin. Control—control sample (transconjugant obtained from the strain before HPP treatment); 200 MPa—transconjugant obtained from the strain after exposure to 200 MPa pressure; 400 MPa—transconjugant obtained from the recovered strain after exposure to 400 MPa pressure. ^{g}—gene present only in genomic DNA; ^{p}—gene present only in plasmid DNA; no superscript ($^{p/g}$)—gene present in both genomic and plasmid DNA; NA—not applicable.

2.3.3. Changes in the Values of Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) in the Obtained Transconjugants

The obtained transconjugants were tested for MIC values (Table 6). MIC values were from 0.5 to 2 μg/mL for tetracycline, 2–256 μg/mL for lincomycin, 0.25–2 μg/mL for ciprofloxacin, 128–256 μg/mL for fosfomycin and 1–2 μg/mL for clindamycin. The values obtained were generally higher than in the donors, with a few cases of a decrease in MIC for lincomycin TC-Lm_2 200 MPa (in situ), TC-Lm_2 200 MPa (in vitro), TC-Lm_1 200 MPa (in vitro), TC-Lm_1 200 MPa (in situ)), fosfomycin (TC-Lm_2 200 MPa (in situ), TC-Lm_3 200 MPa (in situ), TC-Lm_2 200 MPa (in vitro), TC-Lm_2 400 MPa_recovery (in vitro), TC-Lm_1 Control (in situ), TC-Lm_2 Control (in situ), TC-Lm_2 400 MPa_recovery MPa (in vitro)) and clindamycin (TC-Lm_4 da 200 MPa (in situ), TC-Lm_1 200 MPa (in vitro), TC-Lm_1 400 MPa_recovery MPa (in vitro), TC-Lm_5 Control (in vitro), TC-Lm_5 Control (in situ)) and several cases of unrecorded changes in MIC values for fosfomycin (TC-Lm_2 200 MPa (in situ), TC-Lm_1 200 MPa (in situ), TC-Lm_1 200 MPa (in vitro), TC-Lm_1 Control (in vitro), TC-Lm_1 400 MPa_recovery (in vitro)), tetracycline (TC-Lm_5 200 MPa (in situ)) and clindamycin (TC-Lm_3 400 MPa_recovery (in situ), TC-Lm_1 Control (in vitro), TC-Lm_1 Control (in situ)). There was an increase in MIC values in all casesm compared to the donors for ciprofloxacin. These results show that the transconjugants had antibiotic-resistance genes that were expressed.

Table 6. Results of changes in the values of minimum inhibitory concentrations (MICs) in microbial culture medium (in vitro) and food matrix (in situ) before and after exposure to HPP.

Antibiotic	TC	Microbial Culture Medium (In Vitro)			Food Matrix (In Situ)		
		Control	200 MPa	Recovery After 400 MPa	Control	200 MPa	Recovery After 400 MPa
		MIC's Values [μg/mL]					
TET	TC-Lm_1	2 (×8↑)	1 (×4↑)	1 (×4↑)	1 (×4↑)	1 (×4↑)	1 (×4↑)
	TC-Lm_2	2 (×16↑)	2 (×16↑)	1 (×8↑)	1 (×8↑)	1 (×8↑)	1 (×8↑)
	TC-Lm_3	2 (×8↑)	1 (×4↑)	1 (×4↑)	1 (×4↑)	1 (×4↑)	1 (×4↑)
	TC-Lm_4	1 (×8↑)	1 (×8↑)	1 (×8↑)	1 (×8↑)	0.50 (×4↑)	1 (×8↑)
	TC-Lm_5	2 (×4↑)	1 (×2↑)	1 (×2↑)	1 (×2↑)	1 (×2↑)	1 (×2↑)
	TC-Lm_6	2 (×4↑)	1 (×2↑)	1 (×2↑)	1 (×2↑)	0.50 (-)	1 (×2↑)
LIN	TC-Lm_1	64 (×4↑)	4 (×4↓)	32 (×2↑)	32 (×2↑)	8 (×2↓)	32 (×2↑)
	TC-Lm_2	32 (×4↑)	4 (×2↓)	32 (×4↑)	32 (×4↑)	4 (×2↓)	32 (×4↑)
	TC-Lm_3	64 (×128↑)	4 (×8↑)	32 (×64↑)	32 (×64↑)	4 (×8↑)	32 (×64↑)
	TC-Lm_4	128 (×128↑)	8 (×8↑)	32 (×32↑)	32 (×32↑)	4 (×4↑)	32 (×32↑)
	TC-Lm_5	32 (×64↑)	8 (×16↑)	32 (×64↑)	16 (×32↑)	2 (×4↑)	16 (×32↑)
	TC-Lm_6	64 (×128↑)	8 (×16↑)	32 (×64↑)	16 (×32↑)	2 (×4↑)	16 (×32↑)
CIP	TC-Lm_1	1 (×8↑)	0.50 (×4↑)	1 (×8↑)	2 (×16↑)	1 (×8↑)	1 (×8↑)
	TC-Lm_2	1 (×8↑)	0.25 (×2↑)	1 (×8↑)	2 (×16↑)	1 (×8↑)	1 (×8↑)
	TC-Lm_3	2 (×16↑)	1 (×8↑)	1 (×8↑)	2 (×16↑)	1 (×8↑)	1 (×8↑)
	TC-Lm_4	2 (×16↑)	1 (×8↑)	1 (×8↑)	1 (×8↑)	1 (×8↑)	1 (×8↑)
	TC-Lm_5	2 (×16↑)	1 (×8↑)	1 (×8↑)	2 (×16↑)	1 (×8↑)	1 (×8↑)
	TC-Lm_6	1 (×4↑)	0.50 (×2↑)	1 (×4↑)	1 (×4↑)	1 (×4↑)	1 (×4↑)
FOS	TC-Lm_1	256 (-)	256 (-)	256 (-)	128 (×2↓)	256 (-)	256 (-)
	TC-Lm_2	256 (-)	256 (-)	256 (-)	128 (×2↓)	256 (-)	256 (-)
	TC-Lm_3	256 (×64↑)	256 (×64↑)	256 (×64↑)	128 (×32↑)	256 (×64↑)	256 (×64↑)
	TC-Lm_4	128 (×64↑)	256 (×128↑)	256 (×128↑)	256 (×128↑)	256 (×128↑)	256 (×128↑)
	TC-Lm_5	128 (×8↑)	256 (×16↑)	256 (×16↑)	256 (×16↑)	256 (×16↑)	256 (×16↑)
	TC-Lm_6	128 (×4↑)	256 (×8↑)	256 (×8↑)	256 (×8↑)	256 (×8↑)	256 (×8↑)

Table 6. *Cont.*

Antibiotic	TC	Microbial Culture Medium (In Vitro)			Food Matrix (In Situ)		
		Control	200 MPa	Recovery After 400 MPa	Control	200 MPa	Recovery After 400 MPa
		MIC's Values [μg/mL]					
DA	TC-Lm_1	2 (-)	1 (×2↓)	1 (×2↓)	2 (-)	2 (-)	1 (×2↓)
	TC-Lm_2	1 (×4↑)	1 (×4↑)	1 (×4↑)	1 (×4↑)	2 (×8↑)	2 (×8↑)
	TC-Lm_3	1 (-)	2 (×2↑)	1 (-)	2 (×2↑)	2 (×2↑)	1 (-)
	TC-Lm_4	1 (×8↑)	2 (×16↑)	2 (×16↑)	2 (×16↑)	1 (×8↑)	2 (×16↑)
	TC-Lm_5	1 (×1.5↓)	2 (×1.3↑)	2 (×1.3↑)	1 (×1.5↓)	2 (×1.3↑)	2 (×1.3↑)
	TC-Lm_6	1 (×2↑)	2 (×4↑)	2 (×4↑)	1 (×2↑)	1 (×2↑)	2 (×4↑)

Abbreviations: TC—transconjugant; TET—tetracycline, LIN—lincomycin, CIP—ciprofloxacin, FOS—fosfomycin, DA—clindamycin; Control—control sample (transconjugant obtained from the strain before HPP treatment); 200 MPa—transconjugant obtained from the strain after exposure to 200 MPa pressure; 400 MPa—transconjugant obtained from the recovered strain after exposure to 400 MPa pressure. Values in parentheses—indicate how many times the MIC value increased (↑), decreased (↓), or remained unchanged (-) in transconjugants compared to the donor strains.

3. Discussion

L. monocytogenes is known for its high resistance to environmental stresses, including high pressure, allowing it to survive in various environments, especially food. Studies indicate that the survival of bacteria, such as *L. monocytogenes*, may vary significantly depending on the food matrix, which may exhibit protective properties against the microorganisms [25]. In our study, the effect of pressure on bacterial survival differed between in vitro and in situ conditions in the food matrix, which was carrot juice. This aligns with the existing literature, which suggests that bacterial survival under physico-chemical stress depends on environmental factors such as substrate and stress intensity [25]. Our statistical analysis supports this observation by showing that environmental factors, such as the food matrix and pressure levels, significantly influence bacterial survival and the frequency of gene transfer under HPP conditions. For instance, Friedman's ANOVA highlighted the effect of in situ conditions on ciprofloxacin resistance transfer frequencies ($p = 0.002479$), suggesting that food matrices like carrot juice provide a protective environment mitigating pressure-induced stress.

In our study, higher pressure reduced bacterial numbers below the limits of detection in vitro, indicating that extreme conditions in simple media can lead to bacterial death. This finding aligns with research highlighting the need for stress-resistance mechanisms under such conditions [26]. On the other hand, isolates exposed to high pressure in carrot juice showed greater resistance. Some strains were still detectable, supporting the hypothesis that food matrices may provide a protective effect by mitigating the intensity of external stressors [27]. *L. monocytogenes* can adapt to external stresses, including high pressure, through various defense mechanisms. In fermented products, the bacteria may resist adverse environmental conditions more than in simple microbial media [26]. In studies on foods such as carrot juice, it has been found that food components can promote the survival of *L. monocytogenes*, which may explain the higher CFU/mL values for some strains in our study [28].

The presence of virulent and antibiotic-resistant strains in food and food processing environments suggests the possibility of resistance gene transfer through the food chain [20,29]. Transfer of antibiotic resistance genes in *L. monocytogenes* strains is possible, as confirmed by our study and many other previous studies, and represents a significant public health risk, as it can lead to strains difficult to treat with conventional antibiotics [5,8,18,19,30].

The results on the effect of HPP on the transfer of antibiotic resistance genes between *L. monocytogenes* and *E. faecalis* strains show varying effects depending on the experimental conditions (in vitro vs. in situ) and pressure values. This variability was quantitatively

supported by our findings, which revealed significant differences in gene transfer frequency among antibiotics after exposure to 400 MPa in situ (p = 0.003999). Furthermore, Spearman correlation analysis demonstrated a strong relationship between pressure levels and gene transfer frequency for fosfomycin resistance at 200 MPa (correlation coefficient 0.787172). Our study also confirmed the possibility that transfer of tetracycline resistance genes (*tet_A1*, *tet_A3*, *tetC*) depended on the environmental conditions of the study—all three genes were detected in transconjugants unexposed to HPP and after exposure to 400 MPa in vitro. No transfer of the *tetC* gene was detected after exposure to 200 MPa (in vitro). A similar effect was observed in in situ experiments—the *tetC* gene was not found in any of the transconjugants analyzed, indicating that transfer of this gene was not possible. Also, our previous study [19] suggests the possibility of transfer of so-called silent antibiotic resistance genes encoding resistance to: tetracyclines (*tet*(M), *tet*(L), *tet*(K), *tet*(W), and *tet*(O)) by horizontal gene transfer in both untreated and HPP-exposed strains. A study by Zarzecka et al. (2022) [31] confirms the possibility of horizontal gene transfer between bacterial strains from starter and guard cultures used in food fermentation. Transferability analysis of resistance genes showed that the strains analyzed can horizontally transfer tetracycline resistance genes *tetM* and *tetK*. It is important to observe that, in our study, strains showing initial sensitivity to antibiotics carrying so-called silent antibiotic resistance genes were also capable of gene transfer. Similarly, there was a *fosX* gene (encoding fosfomycin resistance)—transfer was higher at higher pressure values (400 MPa), compared to control and low-pressure samples (200 MPa). However, the effect of HPP was not the same for all the antibiotics analyzed—for some, such as ciprofloxacin, no transfer of the *Lde* gene encoding resistance to this antibiotic was observed under any conditions. In the case of lincomycin, transfer of *lin* gene (encoding resistance to this antibiotic) was only observed in samples not treated with HPP. The scientific literature indicates similar observations, suggesting that environmental stresses, such as high pressure, may affect the process of horizontal gene transfer [5,8,18,19,32–34]. There are suggestions that resistance genes to some antibiotics may be more difficult to transfer under environmental stress [35], and the failure of gene transfer may also be because, in some strains, resistance genes may reside on non-conjugative plasmids that are incapable of transfer by conjugation [32].

Nevertheless, Jahan and Holley (2016) [5] showed that *Listeria* strains can acquire tetracycline and streptomycin resistance through non-plasmid conjugation with *E. faecium* isolated from fermented sausage. This suggests that natural transfer of antibiotic resistance to *Listeria* strains may occur in the food environment, raising concerns about the safety of enterococci strains in food. Similarly, Haubert et al. (2018) [8] report that two isolates carried antibiotic resistance genes, with one carrying the *tetM* resistance gene on a plasmid, indicating potential transfer between bacteria in the food environment. Godziszewska et al. (2016) [30] confirm that food can be a reservoir of antibiotic resistance genes, with the possibility of horizontal gene transfer between different bacterial species.

The effect of HPP on antibiotic resistance gene transfer is complex and dependent on the specific environmental conditions and the type of pressure applied. While under in vitro conditions higher pressure (400 MPa) generally reduced the frequency of gene transfer, under in situ conditions the bacterial response was more complex and included both an increase and decrease in the rate of transfer depending on the combination of bacterial strain and antibiotic. This suggests the need for further research in the context of real food matrices, where environmental factors may significantly affect the effectiveness of HPPs in reducing the spread of antibiotic resistance [34]. Our results are consistent with previous reports, which indicate that moderate pressure (200 MPa) induces only minor genotypic changes, while high pressure (400 MPa) leads to more significant transformations of genetic material. Our results largely agree with the literature on the effects of pressure stress on the bacterial genome, which emphasizes that higher pressure levels induce increasingly intense adaptive changes in bacteria [36,37]. Studies show that HPP can indeed affect ARG transfer, with different pressure levels altering the frequency of conjugation. Zarzecka et al. (2023) [18] found that HPP increased the frequency of transfer of tetracycline and

chloramphenicol resistance genes both in vitro and in food matrices, like the observation of increased transfer at 400 MPa pressure in our study. The differences in the transfer frequency results obtained may be due to the initial sensitivity of the strains to the antibiotics tested—in our study, strains showing sensitivity to antibiotics carrying so-called silent antibiotic resistance genes were used, as in a previous study by the researchers [19]. In contrast, in the other study, the authors [18] only focused on resistant strains. Studies show that HPP, by affecting the structure of bacterial cell membranes, can promote increased cell permeability and potentially increase the frequency of gene transfer [38].

The use of genotypic analysis revealed differences in genetic structure between transconjugants subjected to different pressures. The literature indicates that HPP can cause changes in DNA structure and disruption of cellular processes, which translates into the observed cluster variation on the dendrogram (Figure 1) [17,38,39]. The dendrogram obtained by UPGMA based on ERIC-PCR profiles provides important information on the genetic similarity between *E. faecalis* strain JH2-2 and transconjugants obtained from donors subjected to different levels of pressure. This analysis not only allows us to understand the effect of pressure stress on the bacterial genotype in vitro but also provides important information on potential adaptation mechanisms under more complex environmental conditions, in situ. Statistical evidence further corroborates these findings. For example, Friedman's ANOVA and Spearman correlation analyses demonstrated the genetic impact of HPP-induced stress on transconjugants, particularly at 400 MPa, where more pronounced genetic rearrangements and increased resistance gene transfer were observed. Control samples, representing transconjugants obtained from donors before HPP treatment, show a high degree of genetic similarity, confirming genome stability under conditions without pressure stress. Their close clustering on the dendrogram reflects the stable transfer of genetic material under laboratory conditions. Transconjugants exposed to 200 MPa pressure form a cluster separate from the control group, but show no significant differences, suggesting moderate genetic changes. This is probably due to the mild pressure stress, which induces adaptive responses but does not lead to drastic genetic rearrangements. Similar observations were made by Zarzecka et al. (2023) [18], who indicated that moderate pressure could lead to adaptations, but without significant changes in the bacterial genome compared to higher pressure. The most distinct cluster is formed by transconjugants subjected to 400 MPa pressure, which form a separated group on the dendrogram. This separation suggests that high pressure induces significant changes in the genetic material, probably related to genetic rearrangements or mutations. Similar phenomena have been described in the literature, where high pressure led to significant genome rearrangements, particularly in bacteria adapted to extreme environmental conditions [40]. These reactions may reflect intense selection for increased survival under extreme conditions.

Evidence from studies suggests that *L. monocytogenes* can acquire and potentially transfer antibiotic resistance genes in the food environment, either through conjugation, plasmids, transposons, or other gene transfer mechanisms, often involving different bacterial species [5,8–10,12,13,30]. This phenomenon, documented by the presence of such genes in different strains [14,20], highlights the importance of monitoring and controlling antibiotic-resistant *L. monocytogenes* in the food system to minimize health risks [29,41]. High-quality surveillance and an understanding of the ecological factors influencing resistance gene transfer are key to managing this risk, especially in the context of the potential spread of resistance through the food chain and its impact on listeriosis treatment [42–44].

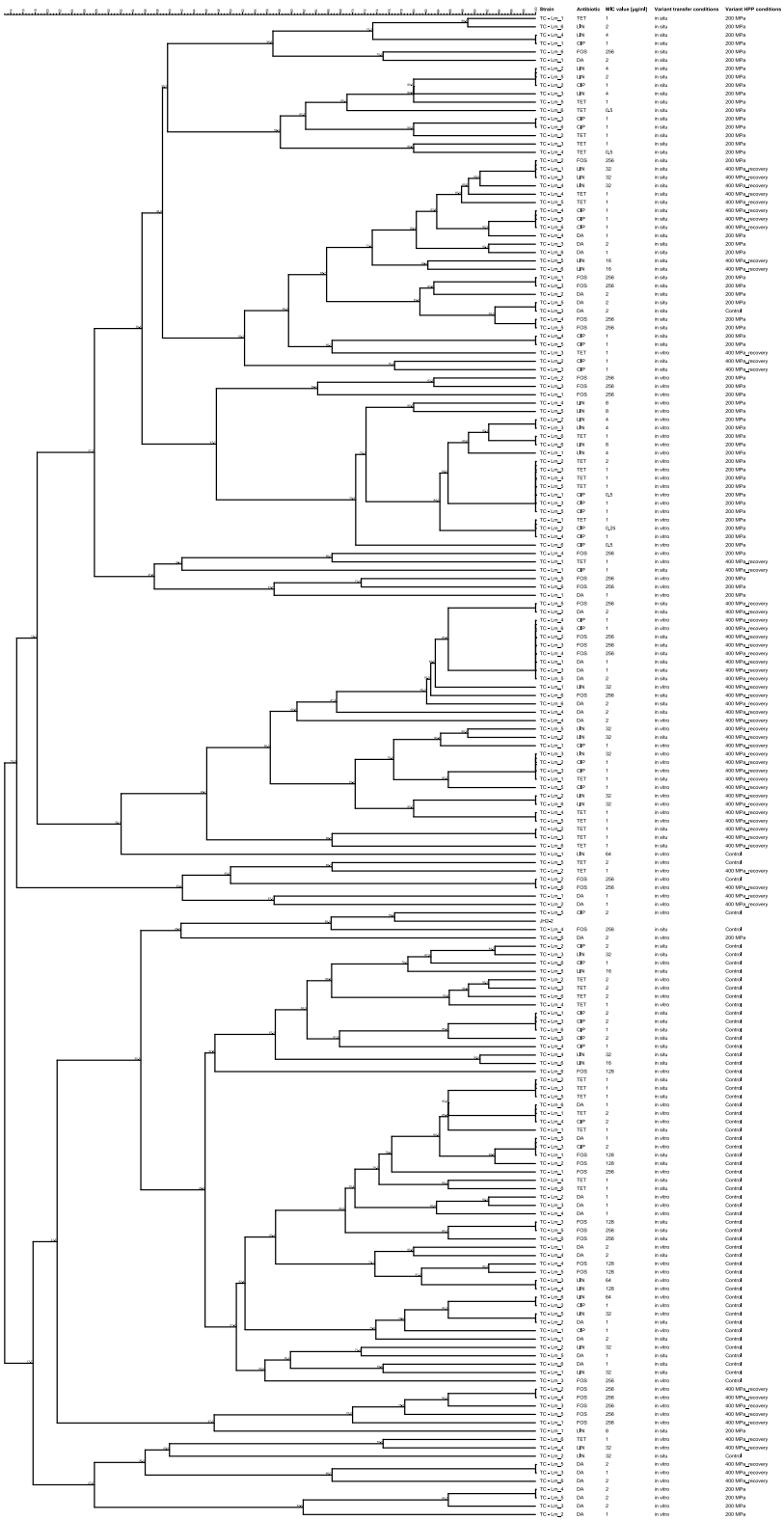


Figure 1. The UPGMA dendrogram obtained from ERIC-PCR profiles shows the restriction pattern similarity between *E. faecalis* JH2-2 and the obtained transconjugants. Abbreviations: TC—transconjugant. Control—control sample (transconjugant obtained from the strain before HPP treatment). 200 MPa—transconjugant obtained from the strain after exposure to 200 MPa pressure; 400 MPa—transconjugant obtained from the recovered strain after exposure to 400 MPa pressure.

4. Materials and Methods

4.1. Isolates Characterization

4.1.1. Donor Isolates Characterization

For this study, six *L. monocytogenes* isolates characterized in earlier studies by the authors for the following: (I) antibiotic resistance characterization were used as donor strains [20]; (II) survival, recovery in vitro, and changes in antibiotic resistance under HPP including the occurrence and expression of genes encoding antibiotic resistance [8]. Isolates were from the collection of isolates of the Department of Food Microbiology, Meat Technology and Chemistry of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn. The results were interpreted as Resistant (R), Intermediate (I), or Sensitive (S). Values were referenced by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [45] and the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines [46].

This study tested donor isolates to determine whether the identified antibiotic-resistance genes were chromosomally or plasmid-located. For this purpose, PCR and real-time PCR reactions were repeated for the resistance genes tested as in previous studies [16,20], using plasmid DNA as a template. According to the manufacturer's instructions, Plasmid DNA was isolated from the strains using the Plasmid Mini DNA Isolation kit (A&A Biotechnology, Gdańsk Poland).

Briefly, the real-time PCR reaction was carried out in a 10 µL Master Mix reaction containing 5 µL of PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), 1 µL of forward and reverse primer (800 nM/µL), and 1 µL of extracted plasmid DNA, supplemented with ddH2O to final volume. Real-time PCR conditions were as follows: 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min (initial denaturation), 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 s at the annealing temperature specific for each gene analyzed (*tetA_1* (59.7 °C), *tetA_3* (58.1 °C), *tetC* (58.6 °C), *lin* (56.9 °C), and *fosX* (56.9 °C)). The specificity of the real-time PCR product was assessed by constructing a melting curve using a stepwise increase between 60 and 95 °C with 0.5 °C increments for 5 s.

The PCRs were performed using 2 µL of template plasmid DNA, 2 µL of each primer (100 pmol), and 12.5 µL of 2 × DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in a total reaction volume of 25 µL. PCR conditions were as follows for the *Lde* gene (product size—1518 bp): initial denaturation for 3 min at 95 °C, followed by 1 min of denaturation at 95 °C, 45 s annealing at 45 °C, 1 min of extension at 72 °C for a total of 35 cycles and 5 min of final extension at 72 °C; and for *lnuA* gene (product size—323 bp): initial denaturation for 5 min at 94 °C, followed by 1 min of denaturation at 94 °C, 1 min annealing at 59 °C, 2 min of extension at 72 °C for a total of 35 cycles and 5 min of final extension at 72 °C.

A negative result (no band in the case of the PCR reaction and no increase in fluorescence in the case of real-time PCR) indicated chromosomal localization of the gene. This study only analyzed the transfer of plasmid-localized genes in the isolates. The characteristics of the donor isolates are shown in Table 7.

Table 7. Characteristics of *L. monocytogenes* donor isolates used in this study.

Strain		Serotype	Isolation Source	Antibiotic MICs [µg/mL]					Antibiotic Resistance Genes
				TET	LIN	CIP	FOS	DA	
Lm_1	168	1/2c	Floor drain	0.25 (S)	16 (R)	0.125 (S)	256 (R)	2 (I)	*tetA_1*, *tetA_3*, *tetC*, *lin*, *Lde*, *fosX*, *lnuA*,
Lm_2	165		Floor drain	0.125 (S)	8 (R)	0.125 (S)	>256 (R)	0.25 (S)	*tetA_1*, *tetA_3*, *tetC*, *lin*, *Lde*, *fosX*, *mefA*
Lm_3	177		Production line	0.25 (S)	0.5 (S)	0.125 (S)	4 (S)	1 (I)	*tetA_1*, *tetA_3*, *tetC*, *lin*, *Lde*, *fosX*,

Table 7. *Cont.*

Strain		Serotype	Isolation Source	Antibiotic MICs [μg/mL]					Antibiotic Resistance Genes
				TET	LIN	CIP	FOS	DA	
Lm_4	92	1/2a	Juice	<0.125 (S)	1 (I)	0.125 (S)	2 (S)	0.125 (S)	*tetA_1*, *tetA_3*, *tetC*, *lin*, *Lde*, *fosX*,
Lm_5	167		Floor drain	0.5 (S)	0.5 (S)	0.125 (S)	16 (S)	1.5 (I)	*tetA_1*, *tetA_3*, *tetC*, *lin*, *Lde*, *fosX*,
Lm_6	148		Frozen vegetables	0.5 (S)	0.5 (S)	0.25 (S)	32 (S)	0.5 (S)	*tetA_1*, *tetA_3*, *tetC*, *lin*, *Lde*, *fosX*, *mefA*, *lnuA*

Abbreviation: TET—tetracycline, LIN—lincomycin, CIP—ciprofloxacin, FOS—fosfomycin, DA—clindamycin; R—resistance, I—intermediate resistance, S—susceptible.

4.1.2. Recipient Strain Characterization

E. faecalis JH2-2 strain (LMG 19456) was used as the recipient strain. This strain is plasmid-free and shows resistance to rifampicin (MIC > 256 μg/mL) and fusidic acid (MIC > 256 μg/mL). The strain was subjected to additional resistance characterization tests against the five antibiotics selected in this study (tetracycline (TET), lincomycin (LIN), ciprofloxacin (CIP), fosfomycin (FOS) and clindamycin (DA)) using the microdilution method, according to the previous study [16]. *E. faecalis* ATCC® 29212 was used as the quality control organism.

Until proper analyses, the donor isolates and the recipient strain were stored in microbanks (Biomaxima, Lublin, Poland) at −80 °C. The analyzed isolates were cultured on Tryptic Soy Broth (TSB; Merck, Darmstadt, Germany) at 37 °C for 24 h. Each resulting colony was then streaked onto Tryptic Soy Agar (TSA; Merck, Darmstadt, Germany) and incubated under the same conditions. The resulting cultures were used for further analyses.

4.2. High-Pressure Processing

Each of the six *L. monocytogenes* isolates analyzed was subjected to the stress of two combinations of HPP treatment pressure and time. The conditions of the HPP were applied according to the conditions in previous studies [16]. The study used two pressure variants 200 MPa and 400 MPa for 5 minutes. Briefly, 10 mL of a 24 h culture of each isolate analyzed in Brain Heart Infusion broth (BHI; Merck, Darmstadt, Germany) (in vitro studies) and 10 mL of a 24 h culture of each isolate analyzed in carrot juice (Vital Fresh, Poland) (in situ studies) were transferred to a low-density polyethylene bottle (Kautex, Bonn, Germany) and subjected to HPP treatment in a solution of glycol and water (1:1, v/v), in a U4040 high-pressure single chamber (IWC PAN, Warsaw, Poland, Unipress Equipment Division) at a temperature of 20 ± 3 °C. The rate of pressure build-up was 300 MPa/min, while the pressure relief time was <5 s. Samples not treated with HPP were used as a control. For each isolate tested, tests were carried out in three independent replicates. After HPP treatment, the following steps of this study were carried out.

4.2.1. Survival and Recovery Analysis After HPP Treatment In Vitro and In Situ

The survival rate and the possibility of recovery of the tested strains were checked in two variants—in vitro (in microbiological medium) and in situ (in food matrix—carrot juice), according to the methodology proposed in an earlier study [16]. The survival rate was tested using the plate count method with serial dilutions of isolates before and after HPP treatment and their inoculation on agar for *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA) (Merck, Darmstadt, Germany). After 48 h incubation at 37 °C, colonies grown on the medium were counted and reported as the number of colony-forming units (CFU) per mL. Survival and recovery were tested in three, independent replicates.

When colonies were not detected on the plates using the plate count method (cell count below the detection level of the method), a cell recovery check was performed. The presence or absence of *L. monocytogenes* was monitored immediately after HPP treatment and during storage (at 1-day intervals until growth was detected, at 30 °C). Briefly, 1 mL of

each bacterial culture was transferred into fresh TSB medium (Merck, Darmstadt, Germany) (for in vitro studies) or carrot juice (for in situ studies) and incubated at 30 °C until cell recovery. The suspension was inoculated onto TSA medium (Merck, Darmstadt, Germany), and after growth of each isolate was observed (in triplicate), TSA plates were incubated for 48 h at 30 °C. For growth, five random colonies were confirmed by culture on ALOA agar and incubation for 24 h at 37 °C. The experiment was repeated three times. After recovery, isolates were cultured on fresh TSB and immediately subjected to the next test steps.

4.2.2. Change in Antibiotic Resistance

After applying HPP, MIC values were determined for five antibiotics: lincomycin, fosfomycin, tetracycline, ciprofloxacin, and clindamycin. Changes in MIC values were performed directly after stress treatment (200 MPa/5 min), and after the recovery of cells during storage (after exposure to 400 MPa/5 min). MIC values were determined using the microdilution method according to the previous study [16]. MIC values were read after a 20 h incubation at 35 ± 2 °C. The MIC value was the lowest antibiotic concentration at which no visible growth was observed in the microtiter plate wells. Values were referenced by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [45] and the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines [46]. Results were interpreted as susceptible (S), intermediate resistant (I), or resistant (R).

4.3. Transfer of Antibiotic Resistance Gene

In the study, the transfer of seven genes encoding resistance to five different antibiotics was analyzed—tetracycline (*tetA_1*, *tetA_3*, *tetC*), lincomycin (*lin*), ciprofloxacin (*Lde*), fosfomycin (*fosX*), and clindamycin (*lnuA*) in isolates possessing plasmid-encoded genes.

4.3.1. In Vitro

The experiment was performed using the membrane filter method [47]. Strains after HPP in microbial medium (200 MPa/5 min), and strains after recovery in microbial medium (after 400 MPa/5 min) were used as donors, and *E. faecalis* strain JH2-2 was used as the recipient. Donor strains not exposed to HPP treatment were gene transfer controls. Gene transfer was performed according to the scheme presented by Wiśniewski et al. (2024) [19] with some modifications (Figure 2). For strains, regeneration was performed after HPP treatment at 400 MPa/5 min. After the recovery of the cells, gene transfer proceeded according to the mentioned scheme. Three types of solid microbial media were used in this study—the first for transconjugants (T-BHI), containing 100 µg/mL fusidic acid, 50 µg/mL rifampicin and the appropriate concentration of the antibiotic encoding by the gene for which the transfection was performed; second—for donor (TD-BHI), containing only the proper concentration of the antibiotic for which resistance is encoded by the gene for which the transfer was carried out; third—for recipients (B-BHI), containing 100 µg/mL fusidic acid and 50 µg/mL rifampicin. To exclude the possibility of transformation DNase I (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) was added to the plates (100 µg/mL). Transfer results were reported and defined as the transfer frequency, i.e., the number of transconjugant colonies (CFU/mL) divided by the number of donor cells.

4.3.2. In Situ

The possibility of gene transfer in a food matrix was tested using carrot juice (Vital Fresh, Poland). Strains after HPP treatment in carrot juice (200 MPa/5 min). Strains after regeneration in carrot juice (after 400 MPa/5 min) were used as donors, and *E. faecalis* strain JH2-2 was used as the recipient. Donor strains not exposed to HPP treatment were gene transfer controls. Gene transfer was carried out according to Figure 2, using tenfold dilution and inoculation into three previously characterized media: T-BHI, TD-BHI, and B-BHI.

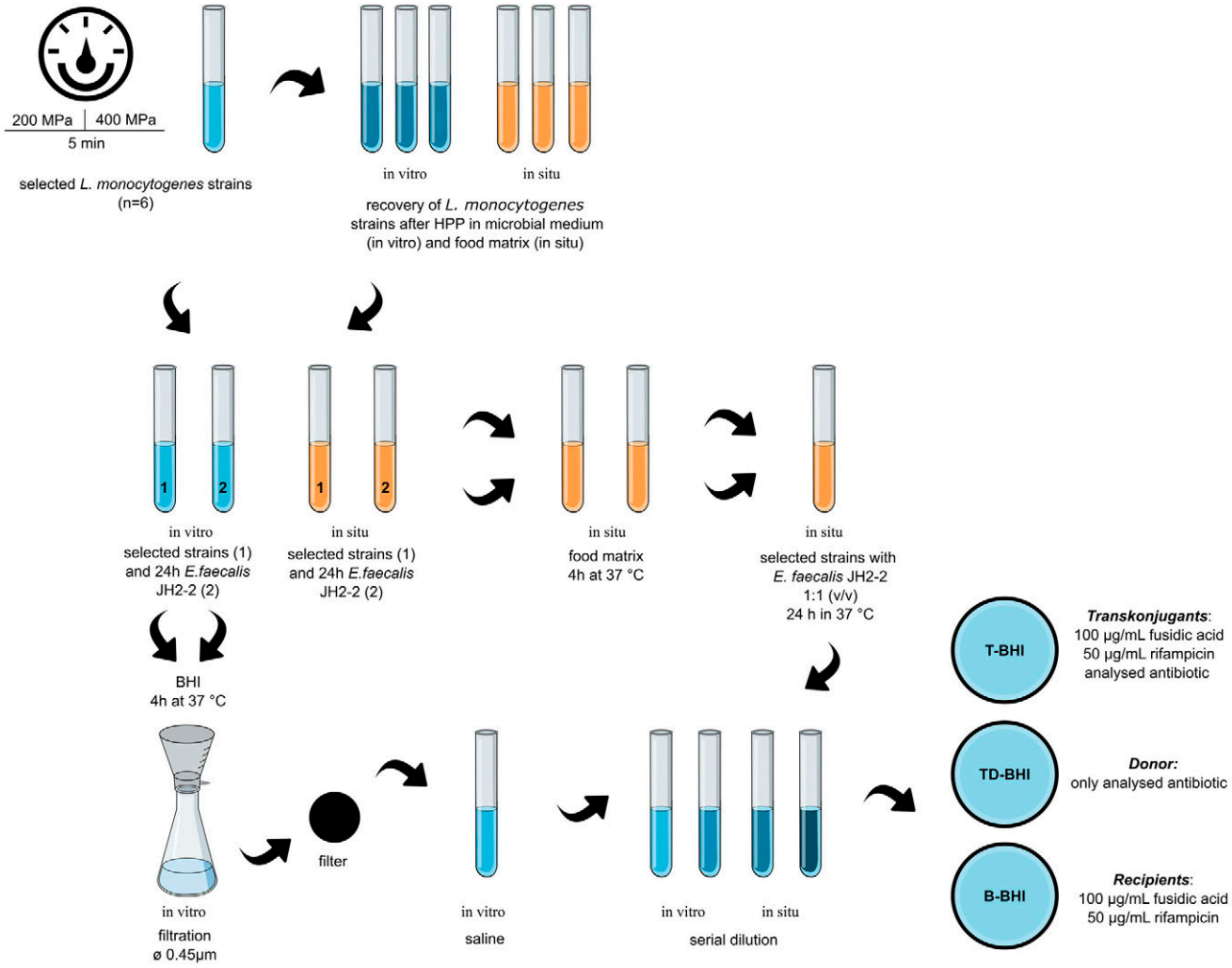


Figure 2. Diagram of transfer of antibiotic resistance genes in vitro and in situ.

4.3.3. Characteristics of the Transconjugants

The transconjugants obtained were analyzed for resistance to the tested antibiotics (determination of MIC values), according to the methodology described earlier in this article (Section 4.2.2. Change in Antibiotic Resistance).

To confirm gene transfer, the isolation of genomic and plasmid DNA from the transconjugants obtained was carried out using the Genomic Mini kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) and Plasmid Mini kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland), respectively, and PCR and real-time PCR reactions were performed for the resistance genes analyzed, following previously studies [16].

All transconjugants obtained were genotyped using molecular typing by enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR), according to Zarzecka et al. (2022) [31]. ERIC-PCR was performed in a 25 µL mixture (12.5 µL DreamTaq Green PCR Master Mix (2×) (ThermoFisher Scientific, Watham, MA, USA), 1.25 µL 10 pmol of each primer, 8.5 µL ddH2O and 1.5 µL DNA template), in a Mastercycler nexus GX2 thermocycler (Eppendorf, Germany). PCR reaction products were separated using electrophoresis in 1.5% agarose gels and imaged using the G-BOX F3 system (Syngene, UK).

For confirmation, the transconjugant fingerprints obtained were matched with those for the recipient strain. BioNumerics software version 7.6.3 (Applied Maths/bioMérieux, Sint-Martens-Latem, Belgium) was used for cluster analysis. Similarity distances between ERIC-PCR profiles were calculated using the Dice coefficient, and the dendrogram was based on an unbalanced clustering coefficient using the arithmetic mean method (UPGMA).

Additionally, for confirmation, all transconjugant strains were genotyped to the species level using PCR and MALDI-TOF as described previously [48].

4.4. Statistical Analysis

A series of statistical tests was used to analyze the resistance gene transfer frequency data to assess the relationships and differences between different experimental conditions. The Shapiro–Wilk test was used to assess the normality of the distribution of resistance gene transfer frequency data in different experiments, such as control, at 200 MPa and recovery at 400 MPa. Since the data did not meet the normality assumption ($p < 0.05$), non-parametric tests were performed. Friedman's ANOVA test was used to analyze differences in gene transfer frequencies between different pressure conditions and to examine the effect of pressure on resistance gene transfer. In addition, the Kruskal–Wallis test was used to compare the frequency of resistance gene transfer between different antibiotics under the same conditions. Finally, the Spearman correlation was used to assess the strength and direction of the relationship between pressure conditions and gene transfer frequency, examining how changes in pressure affect resistance gene transfer in the samples studied. The statistical analysis was conducted using PQStat Software v. 1.8.6 (Poznań, Poland). A significance threshold of $p < 0.05$ was assumed. Data are expressed as mean ± standard deviation (SD) unless otherwise stated.

5. Conclusions

The effect of high-pressure processing on antibiotic resistance gene transfer is complex and depends on specific bacterial strains, resistance genes, and environmental conditions. The present study confirms the findings on the role of HPP in increasing the transfer of ARGs in food-related environments and the potential of strains showing initial antibiotic susceptibility possessing so-called silent antibiotic resistance genes to transfer them. Statistical analysis confirmed significant differences in gene transfer frequencies under different pressure levels and environmental conditions. These findings demonstrate the intricate relationship between pressure conditions, bacterial behavior, and resistance gene transfer.

Our studies show that *L. monocytogenes* show varying resistance to high-pressure processing and are strongly dependent on environmental conditions, such as the composition and properties of the food matrix. The protective properties of food substrates, such as carrot juice, give the bacteria an advantage, allowing some strains to survive under conditions where their growth would be inhibited (in simpler media). This suggests that the interaction between food components and bacterial responses to stress significantly determines bacterial survival under extreme conditions. Furthermore, antibiotic resistance gene transfer between *L. monocytogenes* and *E. faecalis* is influenced by HPP, with higher pressure (400 MPa) generally promoting gene transfer of some resistance genes, such as those for tetracycline (*tet_A1*, *tet_A3*, *tetC*), both in vitro and in situ, while inhibiting the transfer of others (the *Lde* gene—the gene encoding ciprofloxacin resistance) under any conditions. The complexity of this process highlights the potential risk that food environments may pose as reservoirs of ARGs, with the possibility of further resistance transfer along the food chain exacerbated by food processing techniques, such as HPP. Pressure conditions, such as 200 MPa and 400 MPa, had varying effects on the transfer of different resistance genes depending on the antibiotic type and food matrix. This highlights the need for further studies to understand how HPP may influence the risk of resistance gene transfer in real-world food production environments.

Food matrices and related factors can significantly influence the transfer of antibiotic resistance genes. This requires a comprehensive approach to reducing antibiotic resistance in food production systems, carefully selecting processing and preservation methods. Understanding these interactions is key to developing effective strategies to combat the spread of antibiotic resistance in the food production chain.

Genetic analysis of the transconjugants showed that HPP can cause genotypic changes, especially at higher pressures, leading to distinct genetic rearrangements. This highlights

the potential of HPP to influence the genomic stability of bacterial populations in food environments, contributing to adaptive responses under stress conditions. Future research should focus on fully understanding the long-term consequences of genomic rearrangements and developing strategies to mitigate potential risks associated with HPP-induced bacterial adaptations.

Our results suggest that although HPP effectively reduces bacterial populations, its effect on ARG transfer is variable. These findings highlight the need for further research into the use of HPP in food processing, particularly its impact on the spread of antibiotic resistance in the food industry. Effective monitoring and the development of new HPP control strategies will be key to preventing the spread of resistant bacterial strains, which will directly affect public safety and consumer health.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms252312964/s1.

Author Contributions: Conceptualization, P.W. and A.Z.; methodology, P.W., W.C.-W. and A.Z.; formal analysis, P.W.; investigation, P.W.; resources, A.Z.; writing—original draft preparation, P.W.; writing—review and editing, W.C.-W. and A.Z.; visualization, P.W.; supervision, W.C.-W. and A.Z.; funding acquisition, A.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Science Center (Poland) under project No. 2018/29/B/NZ9/00645 (OPUS-15). The APC was funded by the Minister of Science under the Regional Initiative of Excellence Program. The investigation was supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in this article and Supplementary Materials.

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

References

1. FAO; WHO. *Listeria Monocytogenes in Ready-to-Eat (RTE) Foods: Attribution, Characterization and Monitoring*; WHO: Geneva, Switzerland, 2022; ISBN 978-92-5-136983-8.
2. Zhu, Q.; Gooneratne, R.; Hussain, M. *Listeria monocytogenes* in Fresh Produce: Outbreaks, Prevalence and Contamination Levels. *Foods* **2017**, *6*, 21. [CrossRef] [PubMed]
3. Camargo, A.C.; Woodward, J.J.; Call, D.R.; Nero, L.A. *Listeria monocytogenes* in Food-Processing Facilities, Food Contamination, and Human Listeriosis: The Brazilian Scenario. *Foodborne Pathog. Dis.* **2017**, *14*, 623–636. [CrossRef] [PubMed]
4. Ferreira, M.; Almeida, A.; Delgadillo, I.; Saraiva, J.; Cunha, Â. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* to High Pressure Processing: A Review. *Food Rev. Int.* **2016**, *32*, 377–399. [CrossRef]
5. Jahan, M.; Holley, R.A. Transfer of Antibiotic Resistance from *Enterococcus faecium* of Fermented Meat Origin to *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Lett. Appl. Microbiol.* **2016**, *62*, 304–310. [CrossRef]
6. Al-Brefkani, A.M.T. Study the Antimicrobial Resistance Genes of *Listeria monocytogenes* Isolated from Industrial and Clinical Samples in Iraq. *Iraqi J. Sci.* **2023**, *64*, 594–604. [CrossRef]
7. Hanes, R.M.; Huang, Z. Investigation of Antimicrobial Resistance Genes in *Listeria monocytogenes* from 2010 through to 2021. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 5506. [CrossRef] [PubMed]
8. Haubert, L.; Cunha, C.E.P.D.; Lopes, G.V.; Silva, W.P.D. Food Isolate *Listeria monocytogenes* Harboring tetM Gene Plasmid-Mediated Exchangeable to *Enterococcus faecalis* on the Surface of Processed Cheese. *Food Res. Int.* **2018**, *107*, 503–508. [CrossRef]
9. Bertsch, D.; Muelli, M.; Weller, M.; Uruty, A.; Lacroix, C.; Meile, L. Antimicrobial Susceptibility and Antibiotic Resistance Gene Transfer Analysis of Foodborne, Clinical, and Environmental *Listeria* spp. Isolates Including *Listeria monocytogenes*. *MicrobiologyOpen* **2014**, *3*, 118–127. [CrossRef]
10. Haug, M.C.; Tanner, S.A.; Lacroix, C.; Stevens, M.J.A.; Meile, L. Monitoring Horizontal Antibiotic Resistance Gene Transfer in a Colonic Fermentation Model: Resistance Gene Transfer in a Colonic Fermentation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2011**, *78*, 210–219. [CrossRef]
11. Tao, S.; Chen, H.; Li, N.; Wang, T.; Liang, W. The Spread of Antibiotic Resistance Genes In Vivo Model. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **2022**, *2022*, 3348695. [CrossRef]
12. Caplan, M.E.; Mateescu, L.A.; Dimov, T.V.; Rafila, A.; Borcan, A.M. Antibiotic Susceptibility Profiles of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Food Products and Clinical Samples. *Romanian Rev. Lab. Med.* **2014**, *22*, 255–261. [CrossRef]

13. Escolar, C.; Gómez, D.; Del Carmen Rota García, M.; Conchello, P.; Herrera, A. Antimicrobial Resistance Profiles of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* Isolated from Ready-to-Eat Products of Animal Origin in Spain. *Foodborne Pathog. Dis.* **2017**, *14*, 357–363. [CrossRef] [PubMed]
14. Parra-Flores, J.; Holý, O.; Bustamante, F.; Lepuschitz, S.; Pietzka, A.; Contreras-Fernández, A.; Castillo, C.; Ovalle, C.; Alarcón-Lavín, M.P.; Cruz-Córdova, A.; et al. Virulence and Antibiotic Resistance Genes in *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Ready-to-Eat Foods in Chile. *Front. Microbiol.* **2022**, *12*, 796040. [CrossRef]
15. Su, R.; Wen, Y.; Prabakusuma, A.S.; Tang, X.; Huang, A.; Li, L. Prevalence, Antibiotic Resistance and Virulence Feature of *Listeria monocytogenes* Isolated from Bovine Milk in Yunnan, Southwest China. *Int. Dairy J.* **2023**, *144*, 105703. [CrossRef]
16. Wiśniewski, P.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A. High-Pressure Processing—Impacts on the Virulence and Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolated from Food and Food Processing Environments. *Foods* **2023**, *12*, 3899. [CrossRef] [PubMed]
17. Duru, I.C.; Bucur, F.I.; Andreevskaya, M.; Nikparvar, B.; Ylinen, A.; Grigore-Gurgu, L.; Rode, T.M.; Crauwels, P.; Laine, P.; Paulin, L.; et al. High-Pressure Processing-Induced Transcriptome Response during Recovery of *Listeria monocytogenes*. *BMC Genom.* **2021**, *22*, 117. [CrossRef]
18. Zarzecka, U.; Zadernowska, A.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Adamski, P. High-Pressure Processing Effect on Conjugal Antibiotic Resistance Genes Transfer in Vitro and in the Food Matrix among Strains from Starter Cultures. *Int. J. Food Microbiol.* **2023**, *388*, 110104. [CrossRef] [PubMed]
19. Wiśniewski, P.; Zakrzewski, A.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A. Possibility of Transfer and Activation of "silent" Tetracycline Resistance Genes among *Enterococcus faecalis* under High-Pressure Processing. *Food Microbiol.* **2024**, *120*, 104481. [CrossRef]
20. Wiśniewski, P.; Zakrzewski, A.J.; Zadernowska, A.; Chajęcka-Wierzchowska, W. Antimicrobial Resistance and Virulence Characterization of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Food and Food Processing Environments. *Pathogens* **2022**, *11*, 1099. [CrossRef]
21. Myintzaw, P.; Pennone, V.; McAuliffe, O.; Begley, M.; Callanan, M. Association of Virulence, Biofilm, and Antimicrobial Resistance Genes with Specific Clonal Complex Types of *Listeria monocytogenes*. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1603. [CrossRef]
22. Duma, M.N.; Ciupescu, L.M.; Dan, S.D.; Crisan-Reget, O.L.; Tabaran, A. Virulence and Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolated from Ready-to-Eat Food Products in Romania. *Microorganisms* **2024**, *12*, 954. [CrossRef] [PubMed]
23. Manqele, A.; Adesiyun, A.; Mafuna, T.; Pierneef, R.; Moerane, R.; Gcebe, N. Virulence Potential and Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolates Obtained from Beef and Beef-Based Products Deciphered Using Whole-Genome Sequencing. *Microorganisms* **2024**, *12*, 1166. [CrossRef] [PubMed]
24. Rippa, A.; Bilei, S.; Peruzy, M.F.; Marrocco, M.G.; Leggeri, P.; Bossù, T.; Murru, N. Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated in Food and Food-Processing Environments in Italy. *Antibiotics* **2024**, *13*, 525. [CrossRef] [PubMed]
25. Sionek, B.; Szydłowska, A.; Trząskowska, M.; Kołożyn-Krajewska, D. The Impact of Physicochemical Conditions on Lactic Acid Bacteria Survival in Food Products. *Fermentation* **2024**, *10*, 298. [CrossRef]
26. Forchhammer, K. Editorial for Article Collection on "Bacterial Survival Strategies". *Microb. Physiol.* **2021**, *31*, 195–197. [CrossRef] [PubMed]
27. Simões Da Silva, T.M.; Piazentin, A.C.M.; Mendonça, C.M.N.; Converti, A.; Bogsan, C.S.B.; Mora, D.; De Souza Oliveira, R.P. Buffalo Milk Increases Viability and Resistance of Probiotic Bacteria in Dairy Beverages under in Vitro Simulated Gastrointestinal Conditions. *J. Dairy Sci.* **2020**, *103*, 7890–7897. [CrossRef]
28. Tyutkov, N.; Zhernyakova, A.; Birchenko, A.; Eminova, E.; Nadtochii, L.; Baranenko, D. Probiotics Viability in Frozen Food Products. *Food Biosci.* **2022**, *50*, 101996. [CrossRef]
29. Skowron, K.; Wałecka-Zacharska, E.; Wiktorczyk-Kapischke, N.; Skowron, K.J.; Grudlewska-Buda, K.; Bauza-Kaszewska, J.; Bernaciak, Z.; Borkowski, M.; Gospodarek-Komkowska, E. Assessment of the Prevalence and Drug Susceptibility of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Various Types of Meat. *Foods* **2020**, *9*, 1293. [CrossRef]
30. Godziszewska, J.; Guzek, D.; Głąbski, K.; Wierzbicka, A. Mobile antibiotic resistance—The spread of genes determining the resistance of bacteria through food products. *Postępy Hig. Med. Dośw.* **2016**, *70*, 803–810. [CrossRef]
31. Zarzecka, U.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A. Microorganisms from Starter and Protective Cultures—Occurrence of Antibiotic Resistance and Conjugal Transfer of Tet Genes in Vitro and during Food Fermentation. *LWT* **2022**, *153*, 112490. [CrossRef]
32. Yang, C.; Yu, T. Characterization and Transfer of Antimicrobial Resistance in Lactic Acid Bacteria from Fermented Dairy Products in China. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2019**, *13*, 137–148. [CrossRef] [PubMed]
33. Zarzecka, U.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zakrzewski, A.; Zadernowska, A.; Fraqueza, M.J. High Pressure Processing, Acidic and Osmotic Stress Increased Resistance to Aminoglycosides and Tetracyclines and the Frequency of Gene Transfer among Strains from Commercial Starter and Protective Cultures. *Food Microbiol.* **2022**, *107*, 104090. [CrossRef] [PubMed]
34. Li, L.-G.; Zhang, T. Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance Gene Transfer under Environmental Stresses: Insights from Laboratory-Based Studies. *Sci. Total Environ.* **2023**, *887*, 163870. [CrossRef]
35. Jin, B.; Zhou, X.; Zhong, Y.; Li, Q.; Zhang, S.; Mo, H.; Liang, J. The Synergistic Effect of High-Pressure Processing and Pectin on the Physicochemical Stability and Antioxidant Properties of Biopolymer Complexes Composed of Soy Protein and Coumarin. *Process Biochem.* **2021**, *104*, 46–54. [CrossRef]

36. Aertsen, A.; Michiels, C.W. Stress and How Bacteria Cope with Death and Survival. *Crit. Rev. Microbiol.* **2004**, *30*, 263–273. [CrossRef]
37. Bartlett, D.H. Pressure Effects on in Vivo Microbial Processes. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1595*, 367–381. [CrossRef] [PubMed]
38. Sehrawat, R.; Kaur, B.P.; Nema, P.K.; Tewari, S.; Kumar, L. Microbial Inactivation by High-Pressure Processing: Principle, Mechanism and Factors Responsible. *Food Sci. Biotechnol.* **2021**, *30*, 19–35. [CrossRef] [PubMed]
39. Wiśniewski, P.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A. Impact of High-Pressure Processing (HPP) on *Listeria monocytogenes*—An Overview of Challenges and Responses. *Foods* **2023**, *13*, 14. [CrossRef]
40. Dawan, J.; Ahn, J. Bacterial Stress Responses as Potential Targets in Overcoming Antibiotic Resistance. *Microorganisms* **2022**, *10*, 1385. [CrossRef]
41. Ulusoy, B.H.; Chirkena, K. Two Perspectives of *Listeria monocytogenes* Hazards in Dairy Products: The Prevalence and the Antibiotic Resistance. *Food Qual. Saf.* **2019**, *3*, 233–241. [CrossRef]
42. Baquero, F.; Lanza, V.F.; Duval, M.; Coque, T.M. Ecogenetics of Antibiotic Resistance in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **2020**, *113*, 570–579. [CrossRef] [PubMed]
43. Yehia, H.M.; Elkhadragy, M.F.; Aljahani, A.H.; Alarjani, K.M. Prevalence and Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes* in Camel Meat. *Biosci. Rep.* **2020**, *40*, BSR20201062. [CrossRef] [PubMed]
44. Deka, A.; Hazarika, R.A.; Barua, A.G.; Saikia, G.K.; Borah, P.; Shakuntala, I.; Roychoudhury, P.; Bora, D.P. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Foods of Animal Origin: Study from Assam, A North-Eastern State of India. *Eur. J. Vet. Med.* **2022**, *2*, 20–25. [CrossRef]
45. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 12.0. Available online: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (accessed on 28 June 2024).
46. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 30th Informational Supplement*; CLSI Document M100; CLSI: Wayne, PA, USA, 2020.
47. Nawaz, M.; Wang, J.; Zhou, A.; Ma, C.; Wu, X.; Moore, J.E.; Cherie Millar, B.; Xu, J. Characterization and Transfer of Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria from Fermented Food Products. *Curr. Microbiol.* **2011**, *62*, 1081–1089. [CrossRef]
48. Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zarzecka, U.; Zadernowska, A. Enterococci Isolated from Plant-Derived Food—Analysis of Antibiotic Resistance and the Occurrence of Resistance Genes. *LWT* **2021**, *139*, 110549. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Table S1. Results of gene transfer in microbial culture medium (*in vitro*) and food matrix (*in situ*) before and after exposure to HPP.

Antibiotic	TC	Microbial culture medium (*in vitro*)			Food matrix (*in situ*)		
		Control	200 MPa	Recovery after 400 MPa	Control	200 MPa	Recovery after 400 MPa
		TC/R±SD					
TET	TC-Lm_1	$4.74\pm0.14 \times 10^{-1}$	$4.73\pm0.14 \times 10^{-1}$	$0.11\pm0.01 \times 10^{1}$	$4.91\pm0.07 \times 10^{-1}$	$4.74\pm0.14 \times 10^{-1}$	$1.51\pm0.03 \times 10^{2}$
	TC-Lm_2	$0.25\pm0.01 \times 10^{1}$	$0.24\pm0.01 \times 10^{1}$	$0.27\pm0.07 \times 10^{1}$	$2.26\pm0.05 \times 10^{-1}$	$0.25\pm0.01 \times 10^{1}$	$0.12\pm0.01 \times 10^{1}$
	TC-Lm_3	$3.53\pm0.03 \times 10^{-1}$	$3.51\pm0.04 \times 10^{-1}$	$0.16\pm0.00 \times 10^{1}$	$2.30\pm0.09 \times 10^{-1}$	$3.55\pm0.16 \times 10^{-1}$	$0.70\pm0.02 \times 10^{-1}$
	TC-Lm_4	$1.29\pm0.02 \times 10^{-1}$	$1.30\pm0.01 \times 10^{-1}$	$3.40\pm0.11 \times 10^{-1}$	$5.69\pm0.05 \times 10^{-1}$	$1.31\pm0.02 \times 10^{-1}$	$0.41\pm0.02 \times 10^{1}$
	TC-Lm_5	$5.21\pm0.06 \times 10^{-2}$	$5.19\pm0.09 \times 10^{-2}$	$0.24\pm0.01 \times 10^{-1}$	$4.71\pm0.07 \times 10^{-1}$	$5.39\pm0.16 \times 10^{-2}$	$0.13\pm0.01 \times 10^{1}$
	TC-Lm_6	$8.00\pm0.06 \times 10^{-1}$	$7.97\pm0.06 \times 10^{-1}$	$0.11\pm0.01 \times 10^{-1}$	$4.71\pm0.08 \times 10^{-1}$	$8.03\pm0.05 \times 10^{-1}$	$0.52\pm0.01 \times 10^{1}$
LIN	TC-Lm_1	$3.01\pm0.02 \times 10^{-1}$	$3.06\pm0.04 \times 10^{-1}$	$8.25\pm0.08 \times 10^{-1}$	$4.79\pm0.04 \times 10^{-1}$	$2.94\pm0.06 \times 10^{-1}$	$0.18\pm0.01 \times 10^{1}$
	TC-Lm_2	$4.01\pm0.01 \times 10^{-1}$	$4.05\pm0.06 \times 10^{-1}$	$3.51\pm0.07 \times 10^{-1}$	$2.12\pm0.13 \times 10^{-1}$	$3.95\pm0.05 \times 10^{-1}$	$6.81\pm0.10 \times 10^{-1}$
	TC-Lm_3	$1.97\pm0.02 \times 10^{-1}$	$1.99\pm0.04 \times 10^{-1}$	$0.10\pm0.00 \times 10^{1}$	$2.17\pm0.07 \times 10^{-1}$	$2.02\pm0.03 \times 10^{-1}$	$3.38\pm0.07 \times 10^{-1}$
	TC-Lm_4	$3.19\pm0.03 \times 10^{-1}$	$3.18\pm0.03 \times 10^{-1}$	$0.10\pm0.00 \times 10^{1}$	$1.93\pm0.02 \times 10^{-1}$	$3.18\pm0.04 \times 10^{-1}$	$0.19\pm0.01 \times 10^{1}$
	TC-Lm_5	$2.10\pm0.01 \times 10^{-1}$	$2.14\pm0.04 \times 10^{-1}$	$7.71\pm0.17 \times 10^{-1}$	$5.19\pm0.10 \times 10^{-1}$	$2.05\pm0.04 \times 10^{-1}$	$0.10\pm0.00 \times 10^{-1}$
	TC-Lm_6	$6.99\pm0.08 \times 10^{-1}$	$7.00\pm0.04 \times 10^{-1}$	$0.11\pm0.01 \times 10^{1}$	$4.62\pm0.07 \times 10^{-1}$	$6.98\pm0.07 \times 10^{-1}$	$0.12\pm0.00 \times 10^{-1}$
CIP	TC-Lm_1	$0.34\pm0.00 \times 10^{1}$	$0.34\pm0.00 \times 10^{1}$	$0.14\pm0.00 \times 10^{1}$	$2.56\pm0.03 \times 10^{-1}$	$0.34\pm0.01 \times 10^{1}$	$8.51\pm0.06 \times 10^{1}$
	TC-Lm_2	$0.26\pm0.00 \times 10^{1}$	$0.26\pm0.01 \times 10^{1}$	$6.76\pm0.30 \times 10^{-1}$	$1.53\pm0.02 \times 10^{-3}$	$0.27\pm0.01 \times 10^{1}$	$6.46\pm0.02 \times 10^{1}$
	TC-Lm_3	$2.70\pm0.01 \times 10^{-1}$	$2.69\pm0.01 \times 10^{-1}$	$8.73\pm0.39 \times 10^{-1}$	$3.53\pm0.32 \times 10^{-3}$	$2.65\pm0.08 \times 10^{-1}$	$2.55\pm0.10 \times 10^{1}$
	TC-Lm_4	$6.15\pm0.05 \times 10^{-1}$	$6.11\pm0.10 \times 10^{-1}$	$1.51\pm0.04 \times 10^{-1}$	$1.51\pm0.18 \times 10^{-1}$	$6.16\pm0.06 \times 10^{-1}$	$1.48\pm0.02 \times 10^{2}$
	TC-Lm_5	$7.30\pm0.02 \times 10^{-1}$	$6.92\pm0.32 \times 10^{-1}$	$0.14\pm0.01 \times 10^{1}$	$7.66\pm0.03 \times 10^{-2}$	$7.08\pm0.19 \times 10^{-1}$	$5.99\pm0.01 \times 10^{1}$
	TC-Lm_6	$1.36\pm0.04 \times 10^{-1}$	$1.38\pm0.01 \times 10^{-1}$	$4.59\pm0.06 \times 10^{-1}$	$1.81\pm0.01 \times 10^{-2}$	$1.37\pm0.03 \times 10^{-1}$	$5.65\pm0.21 \times 10^{2}$
FOS	TC-Lm_1	$3.29\pm0.03 \times 10^{-1}$	$3.36\pm0.09 \times 10^{-1}$	$0.11\pm0.00 \times 10^{1}$	$3.27\pm0.05 \times 10^{-1}$	$3.34\pm0.09 \times 10^{-1}$	$7.47\pm0.13 \times 10^{-1}$
	TC-Lm_2	$3.48\pm0.06 \times 10^{-1}$	$3.51\pm0.05 \times 10^{-1}$	$0.12\pm0.00 \times 10^{1}$	$2.45\pm0.04 \times 10^{-1}$	$3.51\pm0.05 \times 10^{-1}$	$8.84\pm0.20 \times 10^{-1}$
	TC-Lm_3	$2.96\pm0.01 \times 10^{-1}$	$3.03\pm0.07 \times 10^{-1}$	$0.15\pm0.00 \times 10^{1}$	$0.45\pm0.00 \times 10^{1}$	$2.83\pm0.28 \times 10^{-1}$	$4.87\pm0.04 \times 10^{-1}$
	TC-Lm_4	$2.25\pm0.04 \times 10^{-1}$	$2.31\pm0.10 \times 10^{-1}$	$0.12\pm0.01 \times 10^{1}$	$5.64\pm0.05 \times 10^{-1}$	$2.29\pm0.08 \times 10^{-1}$	$0.98\pm0.02 \times 10^{-1}$
	TC-Lm_5	$4.95\pm0.04 \times 10^{-1}$	$4.92\pm0.02 \times 10^{-1}$	$9.49\pm0.20 \times 10^{-1}$	$1.46\pm0.04 \times 10^{-1}$	$5.09\pm0.19 \times 10^{-1}$	$7.17\pm0.18 \times 10^{-1}$
	TC-Lm_6	$0.27\pm0.00 \times 10^{1}$	$2.68\pm0.02 \times 10^{1}$	$0.17\pm0.01 \times 10^{1}$	$1.74\pm0.02 \times 10^{-1}$	$0.27\pm0.00 \times 10^{-1}$	$7.36\pm0.02 \times 10^{-1}$
DA	TC-Lm_1	$3.47\pm0.03 \times 10^{-1}$	$3.43\pm0.05 \times 10^{-1}$	$9.54\pm0.36 \times 10^{-1}$	$6.00\pm0.00 \times 10^{-1}$	$3.49\pm0.03 \times 10^{-1}$	$0.10\pm0.00 \times 10^{-1}$
	TC-Lm_2	$5.24\pm0.08 \times 10^{-1}$	$5.19\pm0.03 \times 10^{-1}$	$3.15\pm0.10 \times 10^{-1}$	$6.77\pm0.03 \times 10^{-1}$	$5.23\pm0.05 \times 10^{-1}$	$6.43\pm0.05 \times 10^{-1}$
	TC-Lm_3	$4.11\pm0.07 \times 10^{-1}$	$4.10\pm0.05 \times 10^{-1}$	$0.40\pm0.51 \times 10^{1}$	$8.47\pm0.46 \times 10^{-2}$	$4.05\pm0.02 \times 10^{-1}$	$5.54\pm0.07 \times 10^{-1}$
	TC-Lm_4	$3.13\pm0.02 \times 10^{-1}$	$3.17\pm0.04 \times 10^{-1}$	$8.94\pm0.09 \times 10^{-1}$	$5.12\pm0.04 \times 10^{-1}$	$3.17\pm0.03 \times 10^{-1}$	$0.16\pm0.00 \times 10^{1}$
	TC-Lm_5	$0.19\pm0.00 \times 10^{1}$	$1.92\pm0.02 \times 10^{-1}$	$8.53\pm0.19 \times 10^{-1}$	$0.10\pm0.00 \times 10^{1}$	$0.19\pm0.00 \times 10^{-1}$	$0.12\pm0.00 \times 10^{-1}$
	TC-Lm_6	$0.37\pm0.01 \times 10^{1}$	$0.38\pm0.01 \times 10^{1}$	$8.56\pm0.30 \times 10^{-1}$	$6.87\pm0.05 \times 10^{-1}$	$0.37\pm0.01 \times 10^{1}$	$8.22\pm0.05 \times 10^{-1}$

Abbreviations: Green – a decrease in the frequency of gene transfer compared to the control value; Red – increase in gene transfer frequency compared to control value; TC – transconjugant; TC/R – transfer rate, TET – tetracycline, LIN – lincomycin, CIP – ciprofloxacin, FOS – fosfomycin, DA – clindamycin; Control – control sample (transconjugant obtained from the strain before HPP treatment); 200 MPa – transconjugant obtained from the strain after exposure to 200 MPa pressure; 400 MPa – transconjugant obtained from the recovered strain after exposure to 400 MPa pressure.

Table S2. Antibiotic resistance gene transfer in *Listeria monocytogenes* strains before exposure to HPP in microbial culture medium (*in vitro*).

		T-BHI	TD-BHI	B-BHI	TC/R	SD – TC/R	Wyniki
		TC – transconjugants	R – recipient	D - donor	Transfer Rate	±	TC/R±SD
TET	Lm_1	9.78×10^{8}	2.00×10^{9}	2.12×10^{9}	4.89×10^{-1}	0.14	$4.74 \pm 0.14 \times 10^{-1}$
		9.70×10^{8}	2.10×10^{9}	2.10×10^{9}	4.62×10^{-1}		
		9.79×10^{8}	2.08×10^{9}	2.11×10^{9}	4.71×10^{-1}		
	Lm_2	5.52×10^{8}	2.20×10^{8}	4.40×10^{8}	0.25×10^{1}	0.01	$0.25 \pm 0.01 \times 10^{1}$
		5.50×10^{8}	2.22×10^{8}	4.41×10^{8}	0.25×10^{1}		
		5.51×10^{8}	2.22×10^{8}	4.43×10^{8}	0.24×10^{1}		
	Lm_3	3.80×10^{8}	1.07×10^{9}	1.32×10^{9}	3.55×10^{-1}	0.03	$3.53 \pm 0.03 \times 10^{-1}$
		3.82×10^{8}	1.09×10^{8}	1.33×10^{9}	3.50×10^{-1}		
		3.85×10^{8}	1.09×10^{8}	1.34×10^{9}	3.53×10^{-1}		
	Lm_4	3.36×10^{8}	2.60×10^{9}	3.20×10^{9}	1.29×10^{-1}	0.02	$1.29 \pm 0.02 \times 10^{-1}$
		3.30×10^{8}	2.59×10^{9}	3.21×10^{9}	1.27×10^{-1}		
		3.38×10^{8}	2.60×10^{9}	3.24×10^{9}	1.30×10^{-1}		
	Lm_5	6.56×10^{8}	1.26×10^{10}	7.56×10^{9}	5.21×10^{-2}	0.06	$5.21 \pm 0.06 \times 10^{-2}$
		6.55×10^{8}	1.27×10^{10}	7.57×10^{9}	5.15×10^{-2}		
		6.58×10^{8}	1.25×10^{10}	7.59×10^{9}	5.26×10^{-2}		
	Lm_6	4.80×10^{8}	6.00×10^{8}	7.40×10^{8}	8.00×10^{-1}	0.06	$8.00 \pm 0.06 \times 10^{-1}$
		4.85×10^{8}	6.10×10^{8}	7.41×10^{8}	7.95×10^{-1}		
		4.85×10^{8}	6.02×10^{8}	7.45×10^{8}	8.06×10^{-1}		
LIN	Lm_1	5.52×10^{8}	1.83×10^{9}	1.12×10^{9}	4.89×10^{-1}	0.02	$3.01 \pm 0.02 \times 10^{-1}$
		5.54×10^{8}	1.85×10^{9}	2.40×10^{9}	4.62×10^{-1}		
		5.55×10^{8}	1.84×10^{9}	2.51×10^{9}	4.71×10^{-1}		
	Lm_2	1.48×10^{8}	3.70×10^{8}	4.90×10^{8}	0.25×10^{1}	0.01	$4.01 \pm 0.01 \times 10^{-1}$
		1.49×10^{8}	3.71×10^{8}	4.81×10^{8}	0.25×10^{1}		
		1.50×10^{8}	3.75×10^{8}	4.73×10^{8}	0.24×10^{1}		
	Lm_3	3.88×10^{8}	1.95×10^{9}	1.42×10^{9}	3.55×10^{-1}	0.02	$1.97 \pm 0.02 \times 10^{-1}$
		3.89×10^{8}	1.99×10^{9}	1.33×10^{9}	3.50×10^{-1}		
		3.85×10^{8}	1.95×10^{9}	1.24×10^{9}	3.53×10^{-1}		
	Lm_4	6.68×10^{8}	2.08×10^{9}	3.70×10^{9}	1.29×10^{-1}	0.03	$3.19 \pm 0.03 \times 10^{-1}$
		6.69×10^{8}	2.09×10^{9}	3.41×10^{9}	1.27×10^{-1}		
		6.66×10^{8}	2.11×10^{9}	3.54×10^{9}	1.30×10^{-1}		
	Lm_5	1.24×10^{9}	5.93×10^{9}	5.56×10^{9}	5.21×10^{-2}	0.01	$2.10 \pm 0.01 \times 10^{-1}$
		1.25×10^{9}	5.94×10^{9}	5.77×10^{9}	5.15×10^{-2}		
		1.25×10^{9}	5.96×10^{9}	5.79×10^{9}	5.26×10^{-2}		
	Lm_6	2.52×10^{8}	3.60×10^{8}	6.50×10^{8}	8.00×10^{-1}	0.08	$6.99 \pm 0.08 \times 10^{-1}$
		2.55×10^{8}	3.61×10^{8}	6.51×10^{8}	7.95×10^{-1}		
		2.51×10^{8}	3.63×10^{8}	6.65×10^{8}	8.06×10^{-1}		
CIP	Lm_1	5.46×10^{8}	1.60×10^{8}	1.12×10^{8}	4.89×10^{-1}	0.00	$0.34 \pm 0.00 \times 10^{1}$
		5.43×10^{8}	1.62×10^{8}	1.10×10^{8}	4.62×10^{-1}		
		5.50×10^{8}	1.62×10^{8}	1.11×10^{8}	4.71×10^{-1}		
	Lm_2	2.60×10^{8}	9.92×10^{7}	4.90×10^{8}	0.25×10^{1}	0.00	$0.26 \pm 0.00 \times 10^{1}$
		2.55×10^{8}	9.90×10^{7}	4.91×10^{8}	0.25×10^{1}		
		2.60×10^{8}	9.89×10^{7}	4.83×10^{8}	0.24×10^{1}		
	Lm_3	2.08×10^{8}	7.80×10^{8}	1.92×10^{9}	3.55×10^{-1}	0.01	$2.70 \pm 0.01 \times 10^{-1}$
		2.09×10^{8}	7.77×10^{8}	1.93×10^{9}	3.50×10^{-1}		

		2.11×10^{8}	7.79×10^{8}	1.94×10^{9}	3.53×10^{-1}		
		2.80×10^{8}	4.60×10^{8}	2.60×10^{9}	1.29×10^{-1}		
	Lm_4	2.85×10^{8}	4.62×10^{8}	2.61×10^{9}	1.27×10^{-1}	0.05	$6.15 \pm 0.05 \times 10^{-1}$
		2.86×10^{8}	4.62×10^{8}	2.64×10^{9}	1.30×10^{-1}		
		7.36×10^{8}	1.01×10^{9}	8.32×10^{9}	5.21×10^{-2}		
	Lm_5	7.33×10^{8}	1.00×10^{9}	8.27×10^{9}	5.15×10^{-2}	0.02	$7.30 \pm 0.02 \times 10^{-1}$
		7.36×10^{8}	1.01×10^{9}	8.29×10^{9}	5.26×10^{-2}		
		1.56×10^{8}	1.12×10^{9}	6.85×10^{8}	8.00×10^{-1}		
	Lm_6	1.57×10^{8}	1.15×10^{9}	6.90×10^{8}	7.95×10^{-1}	0.04	$1.36 \pm 0.04 \times 10^{-1}$
		1.57×10^{8}	1.19×10^{9}	6.92×10^{8}	8.06×10^{-1}		
		1.13×10^{9}	3.46×10^{9}	2.72×10^{9}	3.27×10^{-1}		
	Lm_1	1.15×10^{9}	3.48×10^{9}	2.77×10^{9}	3.30×10^{-1}	0.02	$3.29 \pm 0.03 \times 10^{-1}$
		1.15×10^{9}	3.49×10^{9}	2.77×10^{9}	3.30×10^{-1}		
		9.28×10^{8}	2.62×10^{9}	2.39×10^{9}	3.54×10^{-1}		
	Lm_2	9.29×10^{8}	2.69×10^{9}	2.30×10^{9}	3.45×10^{-1}	0.06	$3.48 \pm 0.06 \times 10^{-1}$
		9.28×10^{8}	2.70×10^{9}	2.32×10^{9}	3.44×10^{-1}		
		1.35×10^{9}	4.57×10^{9}	2.34×10^{9}	2.95×10^{-1}		
	Lm_3	1.36×10^{9}	4.59×10^{9}	2.36×10^{9}	2.96×10^{-1}	0.01	$2.96 \pm 0.01 \times 10^{-1}$
FOS		1.36×10^{9}	4.60×10^{9}	2.39×10^{9}	2.96×10^{-1}		
		1.03×10^{9}	4.69×10^{9}	3.38×10^{9}	2.20×10^{-1}		
	Lm_4	1.05×10^{9}	4.60×10^{9}	3.41×10^{9}	2.28×10^{-1}	0.04	$2.25 \pm 0.04 \times 10^{-1}$
		1.05×10^{9}	4.62×10^{9}	3.36×10^{9}	2.27×10^{-1}		
		1.07×10^{9}	2.18×10^{9}	2.10×10^{9}	4.91×10^{-1}		
	Lm_5	1.09×10^{9}	2.19×10^{9}	2.12×10^{9}	4.98×10^{-1}	0.04	$4.95 \pm 0.04 \times 10^{-1}$
		1.09×10^{9}	2.20×10^{9}	2.10×10^{9}	4.95×10^{-1}		
		8.55×10^{8}	3.13×10^{8}	1.83×10^{9}	0.27×10^{1}		
	Lm_6	8.55×10^{8}	3.15×10^{8}	1.83×10^{9}	0.27×10^{1}	0.00	$0.27 \pm 0.00 \times 10^{1}$
		8.56×10^{8}	3.13×10^{8}	1.87×10^{8}	0.27×10^{1}		
		7.84×10^{8}	2.24×10^{9}	1.32×10^{8}	3.27×10^{-1}		
	Lm_1	7.85×10^{8}	2.26×10^{9}	1.37×10^{8}	3.30×10^{-1}	0.03	$3.47 \pm 0.03 \times 10^{-1}$
		7.89×10^{8}	2.29×10^{9}	1.37×10^{9}	3.30×10^{-1}		
		8.72×10^{8}	1.67×10^{9}	2.39×10^{9}	3.54×10^{-1}		
	Lm_2	8.74×10^{8}	1.69×10^{9}	2.30×10^{9}	3.45×10^{-1}	0.08	$5.24 \pm 0.08 \times 10^{-1}$
		8.79×10^{8}	1.65×10^{9}	2.32×10^{9}	3.44×10^{-1}		
		7.20×10^{8}	1.78×10^{9}	4.64×10^{8}	2.95×10^{-1}		
	Lm_3	7.22×10^{8}	1.75×10^{9}	4.56×10^{8}	2.96×10^{-1}	0.07	$4.11 \pm 0.07 \times 10^{-1}$
DA		7.23×10^{8}	1.73×10^{9}	4.59×10^{8}	2.96×10^{-1}		
		9.28×10^{8}	2.95×10^{9}	3.38×10^{9}	2.20×10^{-1}		
	Lm_4	9.30×10^{8}	2.99×10^{9}	3.41×10^{9}	2.28×10^{-1}	0.02	$3.13 \pm 0.02 \times 10^{-1}$
		9.30×10^{8}	2.98×10^{9}	3.36×10^{9}	2.27×10^{-1}		
		5.64×10^{8}	2.98×10^{8}	6.40×10^{9}	4.91×10^{-1}		
	Lm_5	5.65×10^{8}	2.95×10^{8}	6.42×10^{9}	4.98×10^{-1}	0.00	$0.19 \pm 0.00 \times 10^{1}$
		5.65×10^{8}	2.96×10^{8}	6.50×10^{9}	4.95×10^{-1}		
		6.00×10^{8}	1.60×10^{8}	5.23×10^{8}	0.27×10^{1}		
	Lm_6	6.01×10^{8}	1.63×10^{8}	5.33×10^{8}	0.27×10^{1}	0.01	$0.37 \pm 0.01 \times 10^{1}$
		6.03×10^{8}	1.64×10^{8}	5.27×10^{8}	0.27×10^{1}		

TET – tetracycline, LIN – lincomycin, CIP – ciprofloxacin, FOS – fosfomycin, DA – clindamycin.

Table S3. Antibiotic resistance gene transfer in *Listeria monocytogenes* strains before exposure to HPP in food matrix (*in situ*).

		T-BHI	TD-BHI	B-BHI	TC/R	SD – TC/R	Wyniki
		TC – transconjugants	R – recipient	D - donor	Transfer Rate	±	TC/R±SD
TET	Lm_1	3.28×10^{8}	6.60×10^{8}	1.11×10^{9}	4.97×10^{-1}	0.07	$4.91 \pm 0.07 \times 10^{-1}$
		3.20×10^{8}	6.65×10^{8}	1.19×10^{9}	4.81×10^{-1}		
		3.30×10^{8}	6.68×10^{8}	1.20×10^{9}	4.94×10^{-1}		
	Lm_2	3.68×10^{8}	1.64×10^{9}	1.86×10^{9}	2.24×10^{-1}	0.05	$2.26 \pm 0.05 \times 10^{-1}$
		3.72×10^{8}	1.60×10^{9}	1.89×10^{9}	2.33×10^{-1}		
		3.70×10^{8}	1.67×10^{9}	1.79×10^{9}	2.22×10^{-1}		
	Lm_3	2.80×10^{8}	1.21×10^{9}	1.30×10^{9}	2.32×10^{-1}	0.09	$2.30 \pm 0.09 \times 10^{-1}$
		2.85×10^{8}	1.19×10^{9}	1.39×10^{9}	2.39×10^{-1}		
		2.77×10^{8}	1.27×10^{9}	1.39×10^{9}	2.18×10^{-1}		
	Lm_4	4.40×10^{8}	7.70×10^{8}	1.18×10^{9}	5.71×10^{-1}	0.05	$5.69 \pm 0.05 \times 10^{-1}$
		4.45×10^{8}	7.74×10^{8}	1.18×10^{9}	5.75×10^{-1}		
		4.38×10^{8}	7.79×10^{8}	1.20×10^{9}	5.62×10^{-1}		
	Lm_5	2.13×10^{8}	4.60×10^{8}	8.00×10^{8}	4.63×10^{-1}	0.07	$4.71 \pm 0.07 \times 10^{-1}$
		2.18×10^{8}	4.65×10^{8}	8.21×10^{9}	4.69×10^{-1}		
		2.19×10^{8}	4.55×10^{8}	8.10×10^{9}	4.81×10^{-1}		
	Lm_6	3.18×10^{8}	6.90×10^{8}	1.52×10^{9}	4.61×10^{-1}	0.08	$4.71 \pm 0.08 \times 10^{-1}$
		3.25×10^{8}	6.88×10^{8}	1.59×10^{9}	4.72×10^{-1}		
		3.27×10^{8}	6.80×10^{8}	1.59×10^{9}	4.81×10^{-1}		
LIN	Lm_1	4.56×10^{8}	9.60×10^{8}	2.12×10^{8}	4.97×10^{-1}	0.04	$4.79 \pm 0.04 \times 10^{-1}$
		4.60×10^{8}	9.65×10^{8}	2.17×10^{8}	4.81×10^{-1}		
		4.65×10^{8}	9.58×10^{8}	2.17×10^{9}	4.94×10^{-1}		
	Lm_2	3.86×10^{8}	1.72×10^{9}	2.89×10^{9}	2.24×10^{-1}	0.13	$2.12 \pm 0.13 \times 10^{-1}$
		3.87×10^{8}	1.78×10^{9}	2.80×10^{9}	2.33×10^{-1}		
		3.42×10^{8}	1.76×10^{9}	2.82×10^{9}	2.22×10^{-1}		
	Lm_3	2.44×10^{8}	1.12×10^{9}	4.04×10^{8}	2.32×10^{-1}	0.07	$2.17 \pm 0.07 \times 10^{-1}$
		2.44×10^{8}	1.08×10^{9}	4.06×10^{8}	2.39×10^{-1}		
		2.48×10^{8}	1.19×10^{9}	4.03×10^{8}	2.18×10^{-1}		
	Lm_4	2.76×10^{8}	1.41×10^{9}	2.88×10^{9}	5.71×10^{-1}	0.02	$1.93 \pm 0.02 \times 10^{-1}$
		2.77×10^{8}	1.46×10^{9}	2.81×10^{9}	5.75×10^{-1}		
		2.80×10^{8}	1.46×10^{9}	2.86×10^{9}	5.62×10^{-1}		
	Lm_5	2.68×10^{8}	5.10×10^{8}	2.45×10^{9}	4.63×10^{-1}	0.10	$5.19 \pm 0.10 \times 10^{-1}$
		2.69×10^{8}	5.10×10^{8}	2.48×10^{9}	4.69×10^{-1}		
		2.60×10^{8}	5.15×10^{8}	2.50×10^{9}	4.81×10^{-1}		
	Lm_6	5.44×10^{8}	1.10×10^{9}	8.23×10^{8}	4.61×10^{-1}	0.07	$4.62 \pm 0.07 \times 10^{-1}$
		5.45×10^{8}	1.19×10^{9}	8.33×10^{8}	4.72×10^{-1}		
		5.43×10^{8}	1.15×10^{9}	8.27×10^{8}	4.81×10^{-1}		
CIP	Lm_1	1.68×10^{6}	6.60×10^{8}	1.52×10^{9}	4.97×10^{-1}	0.03	$2.56 \pm 0.03 \times 10^{-1}$
		1.70×10^{6}	6.68×10^{8}	1.55×10^{9}	4.81×10^{-1}		
		1.72×10^{6}	6.63×10^{8}	1.56×10^{9}	4.94×10^{-1}		
	Lm_2	2.52×10^{6}	1.64×10^{9}	1.49×10^{9}	2.24×10^{-1}	0.02	$153 \pm 0.02 \times 10^{-3}$
		2.53×10^{6}	1.69×10^{9}	1.40×10^{9}	2.33×10^{-1}		
		2.56×10^{6}	1.65×10^{9}	1.42×10^{9}	2.22×10^{-1}		
	Lm_3	4.72×10^{6}	1.21×10^{9}	3.50×10^{9}	2.32×10^{-1}	0.32	$3.53 \pm 0.32 \times 10^{-3}$
		4.75×10^{6}	1.25×10^{9}	3.56×10^{9}	2.39×10^{-1}		

		4.76×10^{6}	1.28×10^{9}	3.59×10^{9}	2.18×10^{-1}		
	Lm_4	1.04×10^{8}	7.70×10^{8}	3.68×10^{9}	5.71×10^{-1}		
		1.10×10^{8}	7.75×10^{8}	3.60×10^{9}	5.75×10^{-1}	0.18	$1.51 \pm 0.18 \times 10^{-1}$
		1.04×10^{8}	7.79×10^{8}	3.66×10^{9}	5.62×10^{-1}		
	Lm_5	4.60×10^{6}	6.00×10^{7}	2.80×10^{9}	4.63×10^{-1}		
		4.65×10^{6}	6.10×10^{7}	2.82×10^{9}	4.69×10^{-1}	0.03	$7.66 \pm 0.03 \times 10^{-2}$
		4.65×10^{6}	6.05×10^{7}	2.80×10^{9}	4.81×10^{-1}		
	Lm_6	1.11×10^{7}	6.20×10^{6}	1.55×10^{9}	4.61×10^{-1}		
		1.14×10^{7}	6.25×10^{6}	1.55×10^{9}	4.72×10^{-1}	0.01	$1.81 \pm 0.01 \times 10^{-2}$
		1.15×10^{7}	6.35×10^{6}	1.60×10^{9}	4.81×10^{-1}		
FOS	**Lm_1**	4.56×10^{8}	1.38×10^{9}	1.15×10^{9}	4.97×10^{-1}		
		4.59×10^{8}	1.39×10^{9}	1.15×10^{9}	4.81×10^{-1}	0.05	$3.27 \pm 0.05 \times 10^{-1}$
		4.58×10^{8}	1.43×10^{9}	1.19×10^{9}	4.94×10^{-1}		
	Lm_2	5.28×10^{8}	2.11×10^{9}	6.10×10^{8}	2.24×10^{-1}		
		5.30×10^{8}	2.17×10^{9}	6.11×10^{8}	2.33×10^{-1}	0.04	$2.45 \pm 0.04 \times 10^{-1}$
		5.31×10^{8}	2.20×10^{9}	6.19×10^{8}	2.22×10^{-1}		
	Lm_3	3.56×10^{8}	7.92×10^{7}	2.62×10^{9}	2.32×10^{-1}		
		3.59×10^{8}	7.99×10^{7}	2.69×10^{9}	2.39×10^{-1}	0.00	$0.45 \pm 0.00 \times 10^{1}$
		3.59×10^{8}	7.90×10^{7}	2.64×10^{9}	2.18×10^{-1}		
	Lm_4	5.52×10^{8}	9.90×10^{8}	3.90×10^{9}	5.71×10^{-1}		
		5.59×10^{8}	9.89×10^{8}	3.81×10^{9}	5.75×10^{-1}	0.05	$5.64 \pm 0.05 \times 10^{-1}$
		5.60×10^{8}	9.85×10^{8}	3.84×10^{9}	5.62×10^{-1}		
	Lm_5	2.24×10^{8}	1.59×10^{9}	2.86×10^{9}	4.63×10^{-1}		
		2.29×10^{8}	1.55×10^{9}	2.88×10^{9}	4.69×10^{-1}	0.04	$1.46 \pm 0.04 \times 10^{-1}$
		2.29×10^{8}	1.53×10^{9}	2.94×10^{9}	4.81×10^{-1}		
	Lm_6	3.56×10^{8}	2.01×10^{9}	8.78×10^{8}	4.61×10^{-1}		
		3.59×10^{8}	2.08×10^{9}	8.70×10^{8}	4.72×10^{-1}	0.02	$1.74 \pm 0.02 \times 10^{-1}$
		3.55×10^{8}	2.06×10^{9}	8.70×10^{8}	4.81×10^{-1}		
DA	**Lm_1**	4.08×10^{8}	6.80×10^{8}	1.12×10^{9}	4.97×10^{-1}		
		4.10×10^{8}	6.83×10^{8}	2.40×10^{9}	4.81×10^{-1}	0.00	$6.00 \pm 0.00 \times 10^{-1}$
		4.10×10^{8}	6.85×10^{8}	2.51×10^{9}	4.94×10^{-1}		
	Lm_2	5.00×10^{8}	7.40×10^{8}	4.90×10^{8}	2.24×10^{-1}		
		5.01×10^{8}	7.44×10^{8}	4.81×10^{8}	2.33×10^{-1}	0.03	$6.77 \pm 0.03 \times 10^{-1}$
		5.08×10^{8}	7.46×10^{8}	4.73×10^{8}	2.22×10^{-1}		
	Lm_3	1.11×10^{8}	1.39×10^{9}	1.42×10^{9}	2.32×10^{-1}		
		1.15×10^{8}	1.38×10^{9}	1.33×10^{9}	2.39×10^{-1}	0.46	$8.47 \pm 0.46 \times 10^{-2}$
		1.18×10^{8}	1.30×10^{9}	1.24×10^{9}	2.18×10^{-1}		
	Lm_4	3.78×10^{8}	7.40×10^{8}	3.70×10^{9}	5.71×10^{-1}		
		3.80×10^{8}	7.35×10^{8}	3.41×10^{9}	5.75×10^{-1}	0.04	$5.12 \pm 0.04 \times 10^{-1}$
		3.76×10^{8}	7.40×10^{8}	3.54×10^{9}	5.62×10^{-1}		
	Lm_5	5.12×10^{8}	5.10×10^{8}	5.56×10^{9}	4.63×10^{-1}		
		5.12×10^{8}	5.13×10^{8}	5.77×10^{9}	4.69×10^{-1}	0.00	$0.10 \pm 0.00 \times 10^{1}$
		5.20×10^{8}	5.13×10^{8}	5.79×10^{9}	4.81×10^{-1}		
	Lm_6	5.24×10^{8}	7.60×10^{8}	6.50×10^{8}	4.61×10^{-1}		
		5.29×10^{8}	7.65×10^{8}	6.51×10^{8}	4.72×10^{-1}	0.05	$6.87 \pm 0.05 \times 10^{-1}$
		5.20×10^{8}	7.65×10^{8}	6.65×10^{8}	4.81×10^{-1}		

TET – tetracycline, LIN – lincomycin, CIP – ciprofloxacin, FOS – fosfomycin, DA – clindamycin.

Table S4. Antibiotic resistance gene transfer in *Listeria monocytogenes* strains after exposure to HPP (**200 MPa)** in microbial culture medium (*in vitro*).

		T-BHI	TD-BHI	B-BHI	TC/R	SD – TC/R	Wyniki
		TC – transconjugants	R – recipient	D - donor	Transfer Rate	±	TC/R±SD
TET	Lm_1	9.78×10^{8}	2.00×10^{9}	2.12×10^{9}	4.89×10^{-1}	0.14	$4.73 \pm 0.14 \times 10^{-1}$
		9.70×10^{8}	2.09×10^{9}	2.15×10^{9}	4.64×10^{-1}		
		9.71×10^{8}	2.09×10^{9}	2.17×10^{9}	4.65×10^{-1}		
	Lm_2	5.52×10^{8}	2.20×10^{8}	4.40×10^{8}	0.25×10^{1}	0.01	$0.24 \pm 0.01 \times 10^{1}$
		5.45×10^{8}	2.28×10^{8}	4.42×10^{8}	0.24×10^{1}		
		5.44×10^{8}	2.28×10^{8}	4.45×10^{8}	0.24×10^{1}		
	Lm_3	3.80×10^{8}	1.07×10^{9}	1.32×10^{9}	3.55×10^{-1}	0.04	$3.51 \pm 0.04 \times 10^{-1}$
		3.89×10^{8}	1.12×10^{9}	1.38×10^{9}	3.47×10^{-1}		
		3.85×10^{8}	1.10×10^{9}	1.38×10^{9}	3.50×10^{-1}		
	Lm_4	3.36×10^{8}	2.60×10^{9}	3.20×10^{9}	1.29×10^{-1}	0.01	$1.30 \pm 0.01 \times 10^{-1}$
		3.40×10^{8}	2.61×10^{9}	3.15×10^{9}	1.30×10^{-1}		
		3.41×10^{8}	2.63×10^{9}	3.15×10^{9}	1.30×10^{-1}		
	Lm_5	6.56×10^{8}	1.26×10^{10}	7.56×10^{9}	5.21×10^{-2}	0.09	$5.19 \pm 0.09 \times 10^{-2}$
		6.58×10^{8}	1.29×10^{10}	7.54×10^{9}	5.10×10^{-2}		
		6.59×10^{8}	1.25×10^{10}	7.50×10^{9}	5.27×10^{-2}		
	Lm_6	4.80×10^{8}	6.00×10^{8}	7.40×10^{8}	8.00×10^{-1}	0.06	$7.97 \pm 0.06 \times 10^{-1}$
		4.82×10^{8}	6.09×10^{8}	7.42×10^{8}	7.90×10^{-1}		
		4.85×10^{8}	6.05×10^{8}	7.46×10^{8}	8.02×10^{-1}		
LIN	Lm_1	5.52×10^{8}	1.83×10^{9}	2.12×10^{9}	3.01×10^{-1}	0.04	$3.06 \pm 0.04 \times 10^{-1}$
		5.56×10^{8}	1.80×10^{9}	2.15×10^{9}	3.09×10^{-1}		
		5.60×10^{8}	1.82×10^{9}	2.17×10^{9}	3.08×10^{-1}		
	Lm_2	1.48×10^{8}	3.70×10^{8}	4.40×10^{8}	4.00×10^{-1}	0.06	$4.05 \pm 0.06 \times 10^{-1}$
		1.50×10^{8}	3.73×10^{8}	4.42×10^{8}	4.02×10^{-1}		
		1.52×10^{8}	3.69×10^{8}	4.45×10^{8}	4.12×10^{-1}		
	Lm_3	3.88×10^{8}	1.95×10^{9}	1.32×10^{9}	1.99×10^{-1}	0.04	$1.99 \pm 0.04 \times 10^{-1}$
		3.90×10^{8}	1.99×10^{9}	1.38×10^{9}	1.96×10^{-1}		
		3.92×10^{8}	1.93×10^{9}	1.38×10^{9}	2.03×10^{-1}		
	Lm_4	6.68×10^{8}	2.08×10^{9}	3.20×10^{9}	3.21×10^{-1}	0.03	$3.18 \pm 0.03 \times 10^{-1}$
		6.70×10^{8}	2.12×10^{9}	3.15×10^{9}	3.16×10^{-1}		
		6.72×10^{8}	2.12×10^{9}	3.15×10^{9}	3.17×10^{-1}		
	Lm_5	1.24×10^{9}	5.93×10^{9}	7.56×10^{9}	2.10×10^{-1}	0.04	$2.14 \pm 0.04 \times 10^{-1}$
		1.29×10^{9}	5.93×10^{9}	7.54×10^{9}	2.18×10^{-1}		
		1.29×10^{9}	5.99×10^{9}	7.50×10^{9}	2.15×10^{-1}		
	Lm_6	2.52×10^{8}	3.60×10^{8}	7.40×10^{8}	7.00×10^{-1}	0.04	$7.00 \pm 0.04 \times 10^{-1}$
		2.55×10^{8}	3.62×10^{8}	7.42×10^{8}	7.04×10^{-1}		
		2.55×10^{8}	3.66×10^{8}	7.46×10^{8}	6.97×10^{-1}		
CIP	Lm_1	5.46×10^{8}	1.60×10^{8}	2.12×10^{9}	0.34×10^{1}	0.00	$0.34 \pm 0.00 \times 10^{1}$
		5.47×10^{8}	1.63×10^{8}	2.15×10^{9}	0.34×10^{1}		
		5.49×10^{8}	1.64×10^{8}	2.17×10^{9}	0.34×10^{1}		
	Lm_2	2.60×10^{8}	9.92×10^{7}	4.40×10^{8}	0.26×10^{1}	0.01	$0.26 \pm 0.01 \times 10^{1}$
		2.62×10^{8}	9.94×10^{7}	4.42×10^{8}	0.26×10^{1}		
		2.65×10^{8}	9.92×10^{7}	4.45×10^{8}	0.27×10^{1}		
	Lm_3	2.08×10^{8}	7.80×10^{8}	1.32×10^{9}	2.70×10^{-1}	0.01	$2.69 \pm 0.01 \times 10^{-1}$
		2.10×10^{8}	7.82×10^{8}	1.38×10^{9}	2.69×10^{-1}		
		2.12×10^{8}	7.88×10^{8}	1.38×10^{9}	2.69×10^{-1}		

		2.80×10^{8}	4.60×10^{8}	3.20×10^{9}	6.10×10^{-1}		
	Lm_4	2.89×10^{8}	4.65×10^{8}	3.15×10^{9}	6.22×10^{-1}	0.10	$6.11 \pm 0.10 \times 10^{-1}$
		2.80×10^{8}	4.65×10^{8}	3.15×10^{9}	6.02×10^{-1}		
		7.36×10^{8}	1.01×10^{9}	7.56×10^{9}	7.29×10^{-1}		
	Lm_5	7.42×10^{8}	1.10×10^{9}	7.54×10^{9}	6.75×10^{-1}	0.32	$6.92 \pm 0.32 \times 10^{-1}$
		7.34×10^{8}	1.09×10^{9}	7.50×10^{9}	6.73×10^{-1}		
		1.56×10^{8}	1.12×10^{9}	7.40×10^{8}	1.39×10^{-1}		
	Lm_6	1.59×10^{8}	1.15×10^{9}	7.42×10^{8}	1.38×10^{-1}	0.01	$1.38 \pm 0.01 \times 10^{-1}$
		1.59×10^{8}	1.16×10^{9}	7.46×10^{8}	1.37×10^{-1}		
		1.13×10^{9}	3.46×10^{9}	2.12×10^{9}	3.27×10^{-1}		
	Lm_1	1.20×10^{9}	3.49×10^{9}	2.15×10^{9}	3.44×10^{-1}	0.09	$3.36 \pm 0.09 \times 10^{-1}$
		1.15×10^{9}	3.40×10^{9}	2.17×10^{9}	3.38×10^{-1}		
		9.28×10^{8}	2.62×10^{9}	4.40×10^{8}	3.54×10^{-1}		
	Lm_2	9.25×10^{8}	2.62×10^{9}	4.42×10^{8}	3.53×10^{-1}	0.05	$3.51 \pm 0.05 \times 10^{-1}$
		9.25×10^{8}	2.65×10^{9}	4.45×10^{8}	3.45×10^{-1}		
		1.35×10^{9}	4.57×10^{9}	1.32×10^{9}	2.95×10^{-1}		
	Lm_3	1.40×10^{9}	4.59×10^{9}	1.38×10^{9}	3.05×10^{-1}	0.07	$3.03 \pm 0.07 \times 10^{-1}$
FOS		1.40×10^{9}	4.55×10^{9}	1.38×10^{9}	3.08×10^{-1}		
		1.03×10^{9}	4.69×10^{9}	3.20×10^{9}	2.20×10^{-1}		
	Lm_4	1.09×10^{9}	4.60×10^{9}	3.15×10^{9}	2.37×10^{-1}	0.10	$2.31 \pm 0.10 \times 10^{-1}$
		1.09×10^{9}	4.62×10^{9}	3.15×10^{9}	2.36×10^{-1}		
		1.07×10^{9}	2.18×10^{9}	7.56×10^{9}	4.91×10^{-1}		
	Lm_5	1.09×10^{9}	2.20×10^{9}	7.54×10^{9}	4.95×10^{-1}	0.02	$4.92 \pm 0.02 \times 10^{-1}$
		1.09×10^{9}	2.22×10^{9}	7.50×10^{9}	4.91×10^{-1}		
		8.55×10^{8}	3.13×10^{8}	7.40×10^{8}	2.70×10^{1}		
	Lm_6	8.52×10^{8}	3.19×10^{8}	7.42×10^{8}	2.67×10^{1}	0.02	$2.68 \pm 0.02 \times 10^{1}$
		8.52×10^{8}	3.20×10^{8}	7.46×10^{8}	2.66×10^{1}		
		7.84×10^{8}	2.24×10^{9}	2.12×10^{9}	3.50×10^{-1}		
	Lm_1	7.80×10^{8}	2.26×10^{9}	2.15×10^{9}	3.45×10^{-1}	0.05	$3.43 \pm 0.05 \times 10^{-1}$
		7.80×10^{8}	2.29×10^{9}	2.17×10^{9}	3.40×10^{-1}		
		8.72×10^{8}	1.67×10^{9}	4.40×10^{8}	5.22×10^{-1}		
	Lm_2	8.75×10^{8}	1.69×10^{9}	4.42×10^{8}	5.18×10^{-1}	0.03	$5.19 \pm 0.03 \times 10^{-1}$
		8.79×10^{8}	1.70×10^{9}	4.45×10^{8}	5.17×10^{-1}		
		7.20×10^{8}	1.78×10^{9}	1.32×10^{9}	4.04×10^{-1}		
	Lm_3	7.20×10^{8}	1.75×10^{9}	1.38×10^{9}	4.11×10^{-1}	0.05	$4.10 \pm 0.05 \times 10^{-1}$
DA		7.25×10^{8}	1.75×10^{9}	1.38×10^{9}	4.14×10^{-1}		
		9.28×10^{8}	2.95×10^{9}	3.20×10^{9}	3.15×10^{-1}		
	Lm_4	9.30×10^{8}	2.90×10^{9}	3.15×10^{9}	3.21×10^{-1}	0.04	$3.17 \pm 0.04 \times 10^{-1}$
		9.30×10^{8}	2.96×10^{9}	3.15×10^{9}	3.14×10^{-1}		
		5.64×10^{8}	2.98×10^{8}	7.56×10^{9}	1.90×10^{1}		
	Lm_5	5.69×10^{8}	2.95×10^{8}	7.54×10^{9}	1.93×10^{1}	0.02	$1.92 \pm 0.02 \times 10^{-1}$
		5.69×10^{8}	2.95×10^{8}	7.50×10^{9}	1.93×10^{1}		
		6.00×10^{8}	1.60×10^{8}	7.40×10^{8}	0.38×10^{1}		
	Lm_6	6.02×10^{8}	1.62×10^{8}	7.42×10^{8}	0.37×10^{1}	0.01	$0.38 \pm 0.01 \times 10^{1}$
		6.03×10^{8}	1.60×10^{8}	7.46×10^{8}	0.38×10^{1}		

TET – tetracycline, LIN – lincomycin, CIP – ciprofloxacin, FOS – fosfomycin, DA – clindamycin.

Table S5. Antibiotic resistance gene transfer in *Listeria monocytogenes* strains after exposure to HPP **(recovery after 400 MPa)** in microbial culture medium (*in vitro*).

		T-BHI	TD-BHI	B-BHI	TC/R	SD – TC/R	Wyniki
		TC – transconjugants	R – recipient	D - donor	Transfer Rate	±	TC/R±SD
TET	Lm_1	1.98×10^{8}	1.76×10^{8}	1.23×10^{9}	0.11×10^{1}	0.01	$0.11 \pm 0.01 \times 10^{1}$
		1.89×10^{8}	1.70×10^{8}	1.29×10^{9}	0.11×10^{1}		
		1.95×10^{8}	1.72×10^{8}	1.29×10^{9}	0.13×10^{1}		
	Lm_2	5.26×10^{8}	1.71×10^{8}	2.73×10^{9}	0.19×10^{1}	0.07	$0.27 \pm 0.07 \times 10^{1}$
		5.30×10^{8}	1.79×10^{8}	2.73×10^{9}	0.30×10^{1}		
		5.34×10^{8}	1.70×10^{8}	2.76×10^{9}	0.31×10^{1}		
	Lm_3	4.66×10^{8}	2.95×10^{8}	1.22×10^{9}	0.16×10^{1}	0.00	$0.16 \pm 0.00 \times 10^{1}$
		4.70×10^{8}	2.90×10^{8}	1.22×10^{9}	0.16×10^{1}		
		4.69×10^{8}	2.96×10^{8}	1.29×10^{9}	0.16×10^{1}		
	Lm_4	1.14×10^{8}	3.46×10^{8}	8.32×10^{8}	3.29×10^{-1}	0.11	$3.40 \pm 0.11 \times 10^{-1}$
		1.16×10^{8}	3.40×10^{8}	8.33×10^{8}	3.41×10^{-1}		
		1.20×10^{8}	3.42×10^{8}	8.39×10^{8}	3.51×10^{-1}		
	Lm_5	3.62×10^{8}	1.58×10^{8}	1.02×10^{9}	0.23×10^{1}	0.01	$0.24 \pm 0.01 \times 10^{-1}$
		3.65×10^{8}	1.50×10^{8}	1.09×10^{9}	0.24×10^{1}		
		3.69×10^{8}	1.51×10^{8}	1.02×10^{9}	0.24×10^{1}		
	Lm_6	2.21×10^{8}	2.11×10^{8}	2.24×10^{8}	0.11×10^{1}	0.01	$0.11 \pm 0.01 \times 10^{-1}$
		2.27×10^{8}	2.10×10^{8}	2.25×10^{8}	0.11×10^{1}		
		2.29×10^{8}	2.19×10^{8}	2.29×10^{8}	0.10×10^{1}		
LIN	Lm_1	1.98×10^{8}	2.38×10^{8}	1.23×10^{9}	8.32×10^{-1}	0.08	$8.25 \pm 0.08 \times 10^{-1}$
		1.90×10^{8}	2.30×10^{8}	1.29×10^{9}	8.26×10^{-1}		
		1.95×10^{8}	2.39×10^{8}	1.29×10^{9}	8.16×10^{-1}		
	Lm_2	2.06×10^{8}	5.94×10^{8}	2.73×10^{9}	3.47×10^{-1}	0.07	$3.51 \pm 0.07 \times 10^{-1}$
		2.12×10^{8}	5.90×10^{8}	2.73×10^{9}	3.59×10^{-1}		
		2.08×10^{8}	5.99×10^{8}	2.76×10^{9}	3.47×10^{-1}		
	Lm_3	2.55×10^{8}	2.51×10^{8}	1.22×10^{9}	0.10×10^{1}	0.00	$0.10 \pm 0.00 \times 10^{1}$
		2.50×10^{8}	2.50×10^{8}	1.22×10^{9}	0.10×10^{1}		
		2.53×10^{8}	2.52×10^{8}	1.29×10^{9}	0.10×10^{1}		
	Lm_4	1.99×10^{8}	1.92×10^{8}	8.32×10^{8}	0.10×10^{1}	0.00	$0.10 \pm 0.00 \times 10^{1}$
		1.90×10^{8}	1.90×10^{8}	8.33×10^{8}	0.10×10^{1}		
		1.95×10^{8}	1.94×10^{8}	8.39×10^{8}	0.10×10^{1}		
	Lm_5	1.69×10^{8}	2.18×10^{8}	1.02×10^{9}	7.75×10^{-1}	0.17	$7.71 \pm 0.17 \times 10^{-1}$
		1.65×10^{8}	2.10×10^{8}	1.09×10^{9}	7.86×10^{-1}		
		1.62×10^{8}	2.15×10^{8}	1.02×10^{9}	7.53×10^{-1}		
	Lm_6	2.18×10^{8}	2.08×10^{8}	2.24×10^{8}	0.11×10^{1}	0.01	$0.11 \pm 0.01 \times 10^{1}$
		2.15×10^{8}	2.10×10^{8}	2.25×10^{8}	0.10×10^{1}		
		2.10×10^{8}	2.12×10^{8}	2.29×10^{8}	9.90×10^{-1}		
CIP	Lm_1	1.78×10^{8}	1.27×10^{8}	1.23×10^{9}	0.14×10^{1}	0.00	$0.14 \pm 0.00 \times 10^{1}$
		1.75×10^{8}	1.29×10^{8}	1.29×10^{9}	0.14×10^{1}		
		1.70×10^{8}	1.23×10^{8}	1.29×10^{9}	0.14×10^{1}		
	Lm_2	1.20×10^{8}	1.87×10^{8}	2.73×10^{9}	6.42×10^{-1}	0.30	$6.76 \pm 0.30 \times 10^{-1}$
		1.25×10^{8}	1.80×10^{8}	2.73×10^{9}	6.94×10^{-1}		
		1.29×10^{8}	1.86×10^{8}	2.76×10^{9}	6.93×10^{-1}		
	Lm_3	1.06×10^{8}	1.26×10^{8}	1.22×10^{9}	8.41×10^{-1}	0.39	$8.73 \pm 0.39 \times 10^{-1}$
		1.10×10^{8}	1.20×10^{8}	1.22×10^{9}	9.17×10^{-1}		
		1.05×10^{8}	1.22×10^{8}	1.29×10^{9}	8.61×10^{-1}		

	Lm_4	1.38×10^{8}	9.36×10^{7}	8.32×10^{8}	1.47×10^{-1}	0.04	$1.51 \pm 0.04 \times 10^{-1}$
		1.42×10^{8}	9.33×10^{7}	8.33×10^{8}	1.52×10^{-1}		
		1.45×10^{8}	9.39×10^{7}	8.39×10^{8}	1.54×10^{-1}		
	Lm_5	1.54×10^{8}	1.14×10^{8}	1.02×10^{9}	0.14×10^{1}	0.01	$0.14 \pm 0.01 \times 10^{1}$
		1.50×10^{8}	1.10×10^{8}	1.09×10^{9}	0.14×10^{1}		
		1.52×10^{8}	1.15×10^{8}	1.02×10^{9}	0.13×10^{1}		
	Lm_6	3.04×10^{8}	6.72×10^{7}	2.24×10^{8}	4.52×10^{-1}	0.06	$4.59 \pm 0.06 \times 10^{-1}$
		3.10×10^{8}	6.70×10^{7}	2.25×10^{8}	4.62×10^{-1}		
		3.12×10^{8}	6.75×10^{7}	2.29×10^{8}	4.62×10^{-1}		
FOS	**Lm_1**	2.50×10^{8}	2.24×10^{8}	1.23×10^{9}	0.11×10^{1}	0.00	$0.11 \pm 0.00 \times 10^{1}$
		2.55×10^{8}	2.25×10^{8}	1.29×10^{9}	0.11×10^{1}		
		2.54×10^{8}	2.29×10^{8}	1.29×10^{9}	0.11×10^{1}		
	Lm_2	5.11×10^{8}	4.30×10^{8}	2.73×10^{9}	0.12×10^{1}	0.00	$0.12 \pm 0.00 \times 10^{1}$
		5.16×10^{8}	4.35×10^{8}	2.73×10^{9}	0.12×10^{1}		
		5.18×10^{8}	4.39×10^{8}	2.76×10^{9}	0.12×10^{1}		
	Lm_3	3.30×10^{8}	2.26×10^{8}	1.22×10^{9}	0.15×10^{1}	0.00	$0.15 \pm 0.00 \times 10^{1}$
		3.34×10^{8}	2.27×10^{8}	1.22×10^{9}	0.15×10^{1}		
		3.39×10^{8}	2.29×10^{8}	1.29×10^{9}	0.15×10^{1}		
	Lm_4	1.84×10^{8}	1.62×10^{8}	8.32×10^{8}	0.11×10^{1}	0.01	$0.12 \pm 0.01 \times 10^{1}$
		1.89×10^{8}	1.57×10^{8}	8.33×10^{8}	0.12×10^{1}		
		1.84×10^{8}	1.60×10^{8}	8.39×10^{8}	0.12×10^{1}		
	Lm_5	1.88×10^{8}	1.94×10^{8}	1.02×10^{9}	9.69×10^{-1}	0.20	$9.49 \pm 0.20 \times 10^{-1}$
		1.80×10^{8}	1.90×10^{8}	1.09×10^{9}	9.47×10^{-1}		
		1.85×10^{8}	1.99×10^{8}	1.02×10^{9}	9.30×10^{-1}		
	Lm_6	3.05×10^{8}	1.78×10^{8}	2.24×10^{8}	0.17×10^{1}	0.01	$0.17 \pm 0.01 \times 10^{1}$
		3.09×10^{8}	1.70×10^{8}	2.25×10^{8}	0.18×10^{1}		
		3.00×10^{8}	1.75×10^{8}	2.29×10^{8}	0.17×10^{1}		
DA	**Lm_1**	1.73×10^{8}	1.87×10^{8}	1.23×10^{9}	9.25×10^{-1}	0.36	$9.54 \pm 0.36 \times 10^{-1}$
		1.79×10^{8}	1.80×10^{8}	1.29×10^{9}	9.94×10^{-1}		
		1.78×10^{8}	1.89×10^{8}	1.29×10^{9}	9.42×10^{-1}		
	Lm_2	1.54×10^{8}	4.88×10^{8}	2.73×10^{9}	3.16×10^{-1}	0.10	$3.15 \pm 0.10 \times 10^{-1}$
		1.59×10^{8}	4.90×10^{8}	2.73×10^{9}	3.24×10^{-1}		
		1.50×10^{8}	4.92×10^{8}	2.76×10^{9}	3.05×10^{-1}		
	Lm_3	1.75×10^{8}	1.73×10^{8}	1.22×10^{9}	0.10×10^{1}	0.51	$0.40 \pm 0.51 \times 10^{1}$
		1.79×10^{8}	1.70×10^{8}	1.22×10^{9}	0.11×10^{1}		
		1.78×10^{8}	1.79×10^{8}	1.29×10^{9}	9.94×10^{-1}		
	Lm_4	2.26×10^{8}	2.51×10^{8}	8.32×10^{8}	9.00×10^{-1}	0.09	$8.94 \pm 0.09 \times 10^{-1}$
		2.29×10^{8}	2.59×10^{8}	8.33×10^{8}	8.84×10^{-1}		
		2.29×10^{8}	2.55×10^{8}	8.39×10^{8}	8.98×10^{-1}		
	Lm_5	1.27×10^{8}	1.46×10^{8}	1.02×10^{9}	8.70×10^{-1}	0.19	$8.53 \pm 0.19 \times 10^{-1}$
		1.20×10^{8}	1.40×10^{8}	1.09×10^{9}	8.57×10^{-1}		
		1.24×10^{8}	1.49×10^{8}	1.02×10^{9}	8.32×10^{-1}		
	Lm_6	1.87×10^{8}	2.10×10^{8}	2.24×10^{8}	8.90×10^{-1}	0.30	$8.56 \pm 0.30 \times 10^{-1}$
		1.80×10^{8}	2.15×10^{8}	2.25×10^{8}	8.37×10^{-1}		
		1.84×10^{8}	2.19×10^{8}	2.29×10^{8}	8.40×10^{-1}		

TET – tetracycline, LIN – lincomycin, CIP – ciprofloxacin, FOS – fosfomycin, DA – clindamycin.

Table S6. Antibiotic resistance gene transfer in *Listeria monocytogenes* strains after exposure to HPP (**200 MPa)** in food matrix (*in situ*).

		T-BHI	TD-BHI	B-BHI	TC/R	SD – TC/R	Wyniki
		TC – transconjugants	R – recipient	D - donor	Transfer Rate	±	TC/R±SD
TET	Lm_1	9.78×10^{8}	2.00×10^{9}	2.12×10^{9}	4.89×10^{-1}	0.14	$4.74 \pm 0.14 \times 10^{-1}$
		9.70×10^{8}	2.10×10^{9}	2.19×10^{9}	4.62×10^{-1}		
		9.75×10^{8}	2.07×10^{9}	2.12×10^{9}	4.71×10^{-1}		
	Lm_2	5.52×10^{8}	2.20×10^{8}	4.40×10^{8}	0.25×10^{1}	0.01	$0.25 \pm 0.01 \times 10^{1}$
		5.49×10^{8}	2.22×10^{8}	4.41×10^{8}	0.25×10^{1}		
		5.55×10^{8}	2.29×10^{8}	4.49×10^{8}	0.24×10^{1}		
	Lm_3	3.80×10^{8}	1.07×10^{9}	1.32×10^{9}	3.55×10^{-1}	0.16	$3.55 \pm 0.16 \times 10^{-1}$
		3.80×10^{8}	1.12×10^{9}	1.39×10^{9}	3.39×10^{-1}		
		3.82×10^{8}	1.03×10^{9}	1.32×10^{9}	3.71×10^{-1}		
	Lm_4	3.36×10^{8}	2.60×10^{9}	3.20×10^{9}	1.29×10^{-1}	0.02	$1.31 \pm 0.02 \times 10^{-1}$
		3.40×10^{8}	2.55×10^{9}	3.21×10^{9}	1.33×10^{-1}		
		3.42×10^{8}	2.62×10^{9}	3.29×10^{9}	1.31×10^{-1}		
	Lm_5	6.56×10^{8}	1.26×10^{10}	7.56×10^{9}	5.21×10^{-2}	0.16	$5.39 \pm 0.16 \times 10^{-2}$
		6.60×10^{8}	1.20×10^{10}	7.59×10^{9}	5.50×10^{-2}		
		6.60×10^{8}	1.21×10^{10}	7.50×10^{9}	5.45×10^{-2}		
	Lm_6	4.80×10^{8}	6.00×10^{8}	7.40×10^{8}	8.00×10^{-1}	0.05	$8.03 \pm 0.05 \times 10^{-1}$
		4.85×10^{8}	6.00×10^{8}	7.41×10^{8}	8.08×10^{-1}		
		4.88×10^{8}	6.10×10^{8}	7.49×10^{8}	8.00×10^{-1}		
LIN	Lm_1	5.52×10^{8}	1.83×10^{9}	2.12×10^{9}	3.01×10^{-1}	0.06	$2.94 \pm 0.06 \times 10^{-1}$
		5.50×10^{8}	1.89×10^{9}	2.19×10^{9}	2.91×10^{-1}		
		5.50×10^{8}	1.89×10^{9}	2.12×10^{9}	2.91×10^{-1}		
	Lm_2	1.48×10^{8}	3.70×10^{8}	4.40×10^{8}	4.00×10^{-1}	0.05	$3.95 \pm 0.05 \times 10^{-1}$
		1.45×10^{8}	3.72×10^{8}	4.41×10^{8}	3.90×10^{-1}		
		1.50×10^{8}	3.79×10^{8}	4.49×10^{8}	3.96×10^{-1}		
	Lm_3	3.88×10^{8}	1.95×10^{9}	1.32×10^{9}	1.99×10^{-1}	0.03	$2.02 \pm 0.03 \times 10^{-1}$
		3.88×10^{8}	1.92×10^{9}	1.39×10^{9}	2.02×10^{-1}		
		3.90×10^{8}	1.90×10^{9}	1.32×10^{9}	2.05×10^{-1}		
	Lm_4	6.68×10^{8}	2.08×10^{9}	3.20×10^{9}	3.21×10^{-1}	0.04	$3.18 \pm 0.04 \times 10^{-1}$
		6.65×10^{8}	2.08×10^{9}	3.21×10^{9}	3.20×10^{-1}		
		6.65×10^{8}	2.12×10^{9}	3.29×10^{9}	3.14×10^{-1}		
	Lm_5	1.24×10^{9}	5.93×10^{9}	7.56×10^{9}	2.10×10^{-1}	0.04	$2.05 \pm 0.04 \times 10^{-1}$
		1.20×10^{9}	5.90×10^{9}	7.59×10^{9}	2.03×10^{-1}		
		1.20×10^{9}	5.95×10^{9}	7.50×10^{9}	2.02×10^{-1}		
	Lm_6	2.52×10^{8}	3.60×10^{8}	7.40×10^{8}	7.00×10^{-1}	0.07	$6.98 \pm 0.07 \times 10^{-1}$
		2.55×10^{8}	3.62×10^{8}	7.41×10^{8}	7.04×10^{-1}		
		2.55×10^{8}	3.69×10^{8}	7.49×10^{8}	6.91×10^{-1}		
CIP	Lm_1	5.46×10^{8}	1.60×10^{8}	2.12×10^{9}	0.34×10^{1}	0.01	$0.34 \pm 0.01 \times 10^{1}$
		5.50×10^{8}	1.62×10^{8}	2.19×10^{9}	0.34×10^{1}		
		5.50×10^{8}	1.69×10^{8}	2.12×10^{9}	0.33×10^{1}		
	Lm_2	2.60×10^{8}	9.92×10^{7}	4.40×10^{8}	0.26×10^{1}	0.01	$0.27 \pm 0.01 \times 10^{1}$
		2.65×10^{8}	9.89×10^{7}	4.41×10^{8}	0.27×10^{1}		
		2.65×10^{8}	9.80×10^{7}	4.49×10^{8}	0.27×10^{1}		
	Lm_3	2.08×10^{8}	7.80×10^{8}	1.32×10^{9}	2.70×10^{-1}	0.08	$2.65 \pm 0.08 \times 10^{-1}$
		2.10×10^{8}	7.85×10^{8}	1.39×10^{9}	2.55×10^{-1}		
		2.10×10^{8}	7.80×10^{8}	1.32×10^{9}	2.69×10^{-1}		

		2.80×10^{8}	4.60×10^{8}	3.20×10^{9}	6.10×10^{-1}		
	Lm_4	2.85×10^{8}	4.62×10^{8}	3.21×10^{9}	6.17×10^{-1}	0.06	$6.16 \pm 0.06 \times 10^{-1}$
		2.85×10^{8}	4.59×10^{8}	3.29×10^{9}	6.21×10^{-1}		
		7.36×10^{8}	1.01×10^{9}	7.56×10^{9}	7.29×10^{-1}		
	Lm_5	7.40×10^{8}	1.06×10^{9}	7.59×10^{9}	6.98×10^{-1}	0.19	$7.08 \pm 0.19 \times 10^{-1}$
		7.38×10^{8}	1.06×10^{9}	7.50×10^{9}	6.96×10^{-1}		
		1.56×10^{8}	1.12×10^{9}	7.40×10^{8}	1.39×10^{-1}		
	Lm_6	1.59×10^{8}	1.19×10^{9}	7.41×10^{8}	1.34×10^{-1}	0.03	$1.37 \pm 0.03 \times 10^{-1}$
		1.56×10^{8}	1.12×10^{9}	7.49×10^{8}	1.39×10^{-1}		
		1.13×10^{9}	3.46×10^{9}	2.72×10^{9}	3.27×10^{-1}		
	Lm_1	1.15×10^{9}	3.47×10^{9}	2.79×10^{9}	3.31×10^{-1}	0.09	$3.34 \pm 0.09 \times 10^{-1}$
		1.20×10^{9}	3.49×10^{9}	2.70×10^{9}	3.44×10^{-1}		
		9.28×10^{8}	2.62×10^{9}	2.39×10^{9}	3.54×10^{-1}		
	Lm_2	9.28×10^{8}	2.69×10^{9}	2.39×10^{9}	3.45×10^{-1}	0.05	$3.51 \pm 0.05 \times 10^{-1}$
		9.25×10^{8}	2.62×10^{9}	2.30×10^{9}	3.53×10^{-1}		
		1.35×10^{9}	4.57×10^{9}	2.34×10^{9}	2.95×10^{-1}		
	Lm_3	1.38×10^{9}	4.57×10^{9}	2.35×10^{9}	3.02×10^{-1}	0.28	$2.83 \pm 0.28 \times 10^{-1}$
FOS		1.38×10^{9}	5.50×10^{9}	2.35×10^{9}	2.51×10^{-1}		
		1.03×10^{9}	4.69×10^{9}	3.38×10^{9}	2.20×10^{-1}		
	Lm_4	1.09×10^{9}	4.70×10^{9}	3.39×10^{9}	2.32×10^{-1}	0.08	$2.29 \pm 0.08 \times 10^{-1}$
		1.09×10^{9}	4.65×10^{9}	3.40×10^{9}	2.34×10^{-1}		
		1.07×10^{9}	2.18×10^{9}	2.10×10^{9}	4.91×10^{-1}		
	Lm_5	1.11×10^{9}	2.19×10^{9}	2.14×10^{9}	5.07×10^{-1}	0.19	$5.09 \pm 0.19 \times 10^{-1}$
		1.11×10^{9}	2.10×10^{9}	2.14×10^{9}	5.29×10^{-1}		
		8.55×10^{8}	3.13×10^{8}	1.83×10^{9}	0.27×10^{1}		
	Lm_6	8.55×10^{8}	3.12×10^{8}	1.89×10^{9}	0.27×10^{1}	0.00	$0.27 \pm 0.00 \times 10^{-1}$
		8.50×10^{8}	3.19×10^{8}	1.83×10^{9}	0.27×10^{1}		
		7.84×10^{8}	2.24×10^{9}	2.12×10^{9}	3.50×10^{-1}		
	Lm_1	7.90×10^{8}	2.25×10^{9}	2.19×10^{9}	3.51×10^{-1}	0.03	$3.49 \pm 0.03 \times 10^{-1}$
		7.90×10^{8}	2.29×10^{9}	2.12×10^{9}	3.45×10^{-1}		
		8.72×10^{8}	1.67×10^{9}	4.40×10^{8}	5.22×10^{-1}		
	Lm_2	8.72×10^{8}	1.65×10^{9}	4.41×10^{8}	5.28×10^{-1}	0.05	$5.23 \pm 0.05 \times 10^{-1}$
		8.80×10^{8}	1.70×10^{9}	4.49×10^{8}	5.18×10^{-1}		
		7.20×10^{8}	1.78×10^{9}	1.32×10^{9}	4.04×10^{-1}		
	Lm_3	7.25×10^{8}	1.78×10^{9}	1.39×10^{9}	4.07×10^{-1}	0.02	$4.05 \pm 0.02 \times 10^{-1}$
DA		7.25×10^{8}	1.79×10^{9}	1.32×10^{9}	4.05×10^{-1}		
		9.28×10^{8}	2.95×10^{9}	3.20×10^{9}	3.15×10^{-1}		
	Lm_4	9.30×10^{8}	2.90×10^{9}	3.21×10^{9}	3.21×10^{-1}	0.03	$3.17 \pm 0.03 \times 10^{-1}$
		9.30×10^{8}	2.95×10^{9}	3.29×10^{9}	3.15×10^{-1}		
		5.64×10^{8}	2.98×10^{8}	7.56×10^{9}	0.19×10^{1}		
	Lm_5	5.60×10^{8}	2.90×10^{8}	7.59×10^{9}	0.19×10^{1}	0.00	$0.19 \pm 0.00 \times 10^{-1}$
		5.61×10^{8}	2.92×10^{8}	7.50×10^{9}	0.19×10^{1}		
		6.00×10^{8}	1.60×10^{8}	7.40×10^{8}	0.38×10^{1}		
	Lm_6	6.09×10^{8}	1.63×10^{8}	7.41×10^{8}	0.37×10^{1}	0.01	$0.37 \pm 0.01 \times 10^{1}$
		6.05×10^{8}	1.69×10^{8}	7.49×10^{8}	0.36×10^{1}		

TET – tetracycline, LIN – lincomycin, CIP – ciprofloxacin, FOS – fosfomycin, DA – clindamycin.

Table S7. Antibiotic resistance gene transfer in *Listeria monocytogenes* strains after exposure to HPP (**recovery after 400 MPa)** in food matrix (*in situ*).

		T-BHI	TD-BHI	B-BHI	TC/R	SD – TC/R	Wyniki
		TC – transconjugants	R – recipient	D - donor	Transfer Rate	±	TC/R±SD
TET	Lm_1	1.15×10^{8}	7.70×10^{7}	3.20×10^{8}	1.49×10^{2}	0.03	$1.51 \pm 0.03 \times 10^{2}$
		1.19×10^{8}	7.75×10^{7}	3.20×10^{8}	1.54×10^{2}		
		1.17×10^{8}	7.79×10^{7}	3.28×10^{8}	1.50×10^{2}		
	Lm_2	1.35×10^{8}	1.16×10^{8}	1.50×10^{8}	0.11×10^{1}	0.01	$0.12 \pm 0.01 \times 10^{1}$
		1.39×10^{8}	1.19×10^{8}	1.51×10^{8}	0.12×10^{1}		
		1.35×10^{8}	1.10×10^{8}	1.50×10^{8}	0.12×10^{1}		
	Lm_3	9.60×10^{7}	1.32×10^{8}	1.70×10^{8}	0.72×10^{-1}	0.02	$0.70 \pm 0.02 \times 10^{-1}$
		9.66×10^{7}	1.39×10^{8}	1.76×10^{8}	0.69×10^{-1}		
		9.69×10^{7}	1.39×10^{8}	1.76×10^{8}	0.70×10^{-1}		
	Lm_4	1.15×10^{8}	2.80×10^{8}	1.50×10^{8}	0.41×10^{1}	0.02	$0.41 \pm 0.02 \times 10^{1}$
		1.19×10^{8}	2.86×10^{8}	1.53×10^{8}	0.42×10^{1}		
		1.10×10^{8}	2.80×10^{8}	1.54×10^{8}	0.39×10^{1}		
	Lm_5	1.08×10^{8}	8.60×10^{7}	1.10×10^{8}	0.13×10^{1}	0.01	$0.13 \pm 0.01 \times 10^{1}$
		1.09×10^{8}	8.65×10^{7}	1.16×10^{8}	0.13×10^{1}		
		1.01×10^{8}	8.65×10^{7}	1.15×10^{8}	0.12×10^{1}		
	Lm_6	9.60×10^{8}	1.80×10^{8}	2.70×10^{8}	0.53×10^{1}	0.01	$0.52 \pm 0.01 \times 10^{1}$
		9.65×10^{8}	1.89×10^{8}	2.75×10^{8}	0.51×10^{1}		
		9.66×10^{8}	1.89×10^{8}	2.78×10^{8}	0.51×10^{1}		
LIN	Lm_1	1.50×10^{8}	9.10×10^{7}	3.20×10^{8}	0.19×10^{1}	0.01	$0.18 \pm 0.01 \times 10^{1}$
		1.59×10^{8}	9.10×10^{7}	3.20×10^{8}	0.17×10^{1}		
		1.56×10^{8}	9.04×10^{7}	3.28×10^{8}	0.17×10^{1}		
	Lm_2	6.70×10^{7}	9.80×10^{7}	1.50×10^{8}	6.83×10^{-1}	0.10	$6.81 \pm 0.10 \times 10^{-1}$
		6.75×10^{7}	9.80×10^{7}	1.51×10^{8}	6.89×10^{-1}		
		6.70×10^{7}	9.99×10^{7}	1.50×10^{8}	6.70×10^{-1}		
	Lm_3	6.90×10^{7}	2.03×10^{8}	1.70×10^{8}	3.40×10^{-1}	0.07	$3.38 \pm 0.07 \times 10^{-1}$
		6.99×10^{7}	2.03×10^{8}	1.76×10^{8}	3.44×10^{-1}		
		6.90×10^{7}	2.09×10^{8}	1.76×10^{8}	3.30×10^{-1}		
	Lm_4	2.17×10^{8}	1.08×10^{8}	1.50×10^{8}	0.20×10^{1}	0.01	$0.19 \pm 0.01 \times 10^{1}$
		2.19×10^{8}	1.14×10^{8}	1.53×10^{8}	0.19×10^{1}		
		2.20×10^{8}	1.14×10^{8}	1.54×10^{8}	0.19×10^{1}		
	Lm_5	1.25×10^{8}	1.29×10^{8}	1.10×10^{8}	9.69×10^{-1}	0.00	$0.10 \pm 0.00 \times 10^{-1}$
		1.29×10^{8}	1.23×10^{8}	1.16×10^{8}	0.10×10^{1}		
		1.29×10^{8}	1.23×10^{8}	1.15×10^{8}	0.10×10^{1}		
	Lm_6	1.38×10^{8}	1.11×10^{8}	2.70×10^{8}	0.12×10^{-1}	0.00	$0.12 \pm 0.00 \times 10^{-1}$
		1.39×10^{8}	1.18×10^{8}	2.75×10^{8}	0.12×10^{-1}		
		1.39×10^{8}	1.18×10^{8}	2.78×10^{8}	0.12×10^{-1}		
CIP	Lm_1	5.10×10^{7}	6.00×10^{5}	3.20×10^{8}	8.50×10^{1}	0.06	$8.51 \pm 0.06 \times 10^{1}$
		5.19×10^{7}	6.05×10^{5}	3.20×10^{8}	8.58×10^{1}		
		5.15×10^{7}	6.09×10^{5}	3.28×10^{8}	8.46×10^{1}		
	Lm_2	5.80×10^{7}	9.00×10^{5}	1.50×10^{8}	6.44×10^{1}	0.02	$6.46 \pm 0.02 \times 10^{1}$
		5.88×10^{7}	9.09×10^{5}	1.51×10^{8}	6.46×10^{1}		
		5.88×10^{7}	9.08×10^{5}	1.50×10^{8}	6.48×10^{1}		
	Lm_3	2.90×10^{7}	1.10×10^{6}	1.70×10^{8}	2.63×10^{1}	0.10	$2.55 \pm 0.10 \times 10^{1}$
		2.90×10^{7}	1.19×10^{6}	1.76×10^{8}	2.44×10^{1}		
		2.95×10^{7}	1.15×10^{6}	1.76×10^{8}	2.57×10^{1}		

	Lm_4	1.08×10^{8}	7.40×10^{5}	1.50×10^{8}	1.46×10^{2}	0.02	$1.48 \pm 0.02 \times 10^{2}$
		1.11×10^{8}	7.43×10^{5}	1.53×10^{8}	1.49×10^{2}		
		1.11×10^{8}	7.48×10^{5}	1.54×10^{8}	1.48×10^{2}		
	Lm_5	4.90×10^{7}	8.20×10^{5}	1.10×10^{8}	5.98×10^{1}	0.01	$5.99 \pm 0.01 \times 10^{1}$
		4.94×10^{7}	8.24×10^{5}	1.16×10^{8}	5.98×10^{1}		
		4.99×10^{7}	8.29×10^{5}	1.15×10^{8}	6.00×10^{1}		
	Lm_6	5.90×10^{7}	1.00×10^{5}	2.70×10^{8}	5.90×10^{2}	0.21	$5.65 \pm 0.21 \times 10^{2}$
		5.95×10^{7}	1.08×10^{5}	2.75×10^{8}	5.51×10^{2}		
		5.99×10^{7}	1.08×10^{5}	2.78×10^{8}	5.55×10^{2}		
FOS	**Lm_1**	1.51×10^{8}	2.05×10^{8}	3.20×10^{8}	7.37×10^{-1}	0.13	$7.47 \pm 0.13 \times 10^{-1}$
		1.59×10^{8}	2.09×10^{8}	3.20×10^{8}	7.61×10^{-1}		
		1.55×10^{8}	2.09×10^{8}	3.28×10^{8}	7.42×10^{-1}		
	Lm_2	1.35×10^{8}	1.50×10^{8}	1.50×10^{8}	9.00×10^{-1}	0.20	$8.84 \pm 0.20 \times 10^{-1}$
		1.37×10^{8}	1.54×10^{8}	1.51×10^{8}	8.90×10^{-1}		
		1.37×10^{8}	1.59×10^{8}	1.50×10^{8}	8.62×10^{-1}		
	Lm_3	8.60×10^{7}	1.75×10^{8}	1.70×10^{8}	4.91×10^{-1}	0.04	$4.87 \pm 0.04 \times 10^{-1}$
		8.64×10^{7}	1.77×10^{8}	1.76×10^{8}	4.88×10^{-1}		
		8.64×10^{7}	1.79×10^{8}	1.76×10^{8}	4.83×10^{-1}		
	Lm_4	2.28×10^{8}	2.36×10^{8}	1.50×10^{8}	9.66×10^{-1}	0.02	$0.98 \pm 0.02 \times 10^{-1}$
		2.32×10^{8}	2.39×10^{8}	1.53×10^{8}	9.71×10^{-1}		
		2.32×10^{8}	2.30×10^{8}	1.54×10^{8}	0.10×10^{1}		
	Lm_5	1.42×10^{8}	2.04×10^{8}	1.10×10^{8}	6.96×10^{-1}	0.18	$7.17 \pm 0.18 \times 10^{-1}$
		1.49×10^{8}	2.05×10^{8}	1.16×10^{8}	7.27×10^{-1}		
		1.49×10^{8}	2.05×10^{8}	1.15×10^{8}	7.27×10^{-1}		
	Lm_6	1.36×10^{8}	1.84×10^{8}	2.70×10^{8}	7.39×10^{-1}	0.02	$7.36 \pm 0.02 \times 10^{-1}$
		1.39×10^{8}	1.89×10^{8}	2.75×10^{8}	7.35×10^{-1}		
		1.39×10^{8}	1.89×10^{8}	2.78×10^{8}	7.35×10^{-1}		
DA	**Lm_1**	8.10×10^{7}	8.00×10^{7}	3.20×10^{8}	0.10×10^{-1}	0.00	$0.10 \pm 0.00 \times 10^{-1}$
		8.19×10^{7}	8.01×10^{7}	3.20×10^{8}	0.10×10^{-1}		
		8.19×10^{7}	8.05×10^{7}	3.28×10^{8}	0.10×10^{-1}		
	Lm_2	5.30×10^{7}	8.30×10^{7}	1.50×10^{8}	6.39×10^{-1}	0.05	$6.43 \pm 0.05 \times 10^{-1}$
		5.38×10^{7}	8.30×10^{7}	1.51×10^{8}	6.48×10^{-1}		
		5.39×10^{7}	8.39×10^{7}	1.50×10^{8}	6.42×10^{-1}		
	Lm_3	7.50×10^{7}	1.34×10^{8}	1.70×10^{8}	5.60×10^{-1}	0.07	$5.54 \pm 0.07 \times 10^{-1}$
		7.50×10^{7}	1.35×10^{8}	1.76×10^{8}	5.56×10^{-1}		
		7.59×10^{7}	1.39×10^{8}	1.76×10^{8}	5.46×10^{-1}		
	Lm_4	1.26×10^{8}	8.00×10^{7}	1.50×10^{8}	0.16×10^{1}	0.00	$0.16 \pm 0.00 \times 10^{1}$
		1.29×10^{8}	8.07×10^{7}	1.53×10^{8}	0.16×10^{1}		
		1.29×10^{8}	8.01×10^{7}	1.54×10^{8}	0.16×10^{1}		
	Lm_5	9.50×10^{7}	7.70×10^{7}	1.10×10^{8}	0.12×10^{-1}	0.00	$0.12 \pm 0.00 \times 10^{-1}$
		9.55×10^{7}	7.72×10^{7}	1.16×10^{8}	0.12×10^{-1}		
		9.55×10^{7}	7.74×10^{7}	1.15×10^{8}	0.12×10^{-1}		
	Lm_6	6.40×10^{7}	7.80×10^{7}	2.70×10^{8}	8.21×10^{-1}	0.05	$8.22 \pm 0.05 \times 10^{-1}$
		6.45×10^{7}	7.89×10^{7}	2.75×10^{8}	8.17×10^{-1}		
		6.45×10^{7}	7.80×10^{7}	2.78×10^{8}	8.27×10^{-1}		

TET – tetracycline, LIN – lincomycin, CIP – ciprofloxacin, FOS – fosfomycin, DA – clindamycin.

Statistical tests used in the research.

Table S8. Analyze differences in gene transfer frequencies between different pressure conditions – p value < 0.05 (Friedman's ANOVA test).

Antibiotic	Conditions	
	in vitro	*in situ*
TET	0.311403	0.135335
LIN	0.069483	0.606531
CIP	0.833753	0.002479
FOS	0.114559	0.311403
DA	0.606531	0.846482

TET – tetracycline, LIN – lincomycin, CIP – ciprofloxacin, FOS – fosfomycin, DA – clindamycin.

Table S9. Analyze differences in the effect of pressure on resistance gene transfer – p value < 0.05 (Friedman's ANOVA test).

Conditions	Antibiotic				
	TET	**LIN**	**CIP**	**FOS**	**DA**
Control (*in vitro*)	0.401678	0.036032	1.000000	0.401678	1.000000
200 MPa (*in vitro*)	0.401678	0.036032	1.000000	0.401678	0.401678
Recovery after 400 MPa (*in vitro*)	0.833935	0.201243	0.528233	0.058475	0.401678
Control (*in situ*)	0.035522	0.036032	0.036032	0.401678	0.059058
200 MPa (*in situ*)	0.401678	0.036032	1.000000	0.036032	0.401678
Recovery after 400 MPa (*in situ*)	0.247561	0.529368	0.036032	0.036032	0.208413

TET – tetracycline, LIN – lincomycin, CIP – ciprofloxacin, FOS – fosfomycin, DA – clindamycin. Control – control sample (transconjugant obtained from the strain before HPP treatment); 200 MPa – transconjugant obtained from the strain after exposure to 200 MPa pressure; 400 MPa – transconjugant obtained from the recovered strain after exposure to 400 MPa pressure.

Table S10. The frequency of resistance gene transfer comparisons between different antibiotics under the same conditions – p value < 0.05 (Kruskal-Wallis test).

Conditions	p value
Control (*in vitro*)	0.509103
200 MPa (*in vitro*)	0.799615
Recovery after 400 MPa (*in vitro*)	0.330772
Control (*in situ*)	0.012698
200 MPa (*in situ*)	0.553158
Recovery after 400 MPa (*in situ*)	0.003999

Control – control sample (transconjugant obtained from the strain before HPP treatment); 200 MPa – transconjugant obtained from the strain after exposure to 200 MPa pressure; 400 MPa – transconjugant obtained from the recovered strain after exposure to 400 MPa pressure.

Table S11. Assessment of the strength and direction of the relationship between pressure conditions and the frequency of gene transfer for each antibiotic – p value < 0.05 (Spearman correlation).

Conditions	Antibiotic				
	TET	**LIN**	**CIP**	**FOS**	**DA**
200 MPa	NA	NA	NA	0.787172	NA
Recovery after 400 MPa	0.328723	1.00000	0.199660	0.826848	0.704000

TET – tetracycline, LIN – lincomycin, CIP – ciprofloxacin, FOS – fosfomycin, DA – clindamycin. 200 MPa – transconjugant obtained from the strain after exposure to 200 MPa pressure; 400 MPa – transconjugant obtained from the recovered strain after exposure to 400 MPa pressure.

Table S12. Assessment of the strength and direction of the relationship between pressure conditions and the frequency of gene transfer – p value < 0.05 (Spearman correlation).

Conditions	p values
200 MPa	< 0.000001
Recovery after 400 MPa	0.143678

Olsztyn, dn. 08.06.2026 r.
(miejscowość, data)

mgr inż. Patryk Wiśniewski
(imię i nazwisko kandydata)
Technologia żywności i żywienia
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE
autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: *High-Pressure Processing Influences Antibiotic Resistance Gene Transfer in Listeria monocytogenes Isolated from Food and Processing Environments* (Wiśniewski, P., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2024). *High-Pressure Processing Influences Antibiotic Resistance Gene Transfer in Listeria monocytogenes Isolated from Food and Processing Environments.* International Journal of Molecular Sciences, 25, 12964. https://doi.org/10.3390/ijms252312964) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich dyskusji na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny).

Wiśniewski Patryk
.....
(podpis kandydata)

Olszty, dn. 08.06.2026 r.
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem *High-Pressure Processing Influences Antibiotic Resistance Gene Transfer in Listeria monocytogenes Isolated from Food and Processing Environments* (Wiśniewski, P., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2024). *High-Pressure Processing Influences Antibiotic Resistance Gene Transfer in Listeria monocytogenes Isolated from Food and Processing Environments.* International Journal of Molecular Sciences, 25, 12964. https://doi.org/10.3390/ijms252312964) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: współudziale w opracowaniu metodologii badań, krytycznej rewizji i redakcji manuskryptu oraz sprawowaniu nadzoru naukowego nad realizacją pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Patryka Wiśniewskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Patryka Wiśniewskiego polegający na: udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich dyskusji na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny).

Wioleta Chajęcka-Wierzchowska
.....
podpis

Olsztyn, dn. 08.06.2026 r.
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Anna Zadernowska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem *High-Pressure Processing Influences Antibiotic Resistance Gene Transfer in Listeria monocytogenes Isolated from Food and Processing Environments* (Wiśniewski, P., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2024). *High-Pressure Processing Influences Antibiotic Resistance Gene Transfer in Listeria monocytogenes Isolated from Food and Processing Environments.* International Journal of Molecular Sciences, 25, 12964. https://doi.org/10.3390/ijms252312964) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: współtworzeniu koncepcji badań, opracowaniu metodologii, zapewnieniu zasobów niezbędnych do realizacji badań, recenzji i redakcji manuskryptu, sprawowaniu nadzoru naukowego oraz pozyskaniu finansowania.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Patryka Wiśniewskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Patryka Wiśniewskiego polegający na: udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich dyskusji na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny).

Anna Zadernowska
.....
podpis

Załącznik nr 4

Publikacja P4

Wiśniewski, P., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2024). Impact of High-Pressure Processing (HPP) on *Listeria monocytogenes* – An Overview of Challenges and Responses. *Foods*, 13, 14. https://doi.org/10.3390/foods13010014.

MNiSW – 140, IF – 5.1; WoS – 24; GS – 30; RG – 24

foods

MDPI

Review

Impact of High-Pressure Processing (HPP) on *Listeria monocytogenes*—An Overview of Challenges and Responses

Patryk Wiśniewski *, Wioleta Chajęcka-Wierzchowska and Anna Zadernowska

Department of Food Microbiology, Meat Technology and Chemistry, Faculty of Food Science, University of Warmia and Mazury, Plac Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn, Poland; wioleta.chajecka@uwm.edu.pl (W.C.-W.); anna.zadernowska@uwm.edu.pl (A.Z.)

* Correspondence: patryk.wisniewski@uwm.edu.pl

Abstract: High-pressure processing (HPP) is currently one of the leading methods of non-thermal food preservation as an alternative to traditional methods based on thermal processing. The application of HPP involves the simultaneous action of a combination of several factors—pressure values (100–600 MPa), time of operation (a few–several minutes), and temperature of operation (room temperature or lower)—using a liquid medium responsible for pressure transfer. The combination of these three factors results in the inactivation of microorganisms, thus extending food shelf life and improving the food's microbiological safety. HPP can provide high value for the sensory and quality characteristics of products and reduce the population of pathogenic microorganisms such as *L. monocytogenes* to the required safety level. Nevertheless, the technology is not without impact on the cellular response of pathogens. *L. monocytogenes* cells surviving the HPP treatment may have multiple damages, which may impact the activation of mechanisms involved in the repair of cellular damage, increased virulence, or antibiotic resistance, as well as an increased expression of genes encoding pathogenicity and antibiotic resistance. This review has demonstrated that HPP is a technology that can reduce *L. monocytogenes* cells to below detection levels, thus indicating the potential to provide the desired level of safety. However, problems have been noted related to the possibilities of cell recovery during storage and changes in virulence and antibiotic resistance due to the activation of gene expression mechanisms, and the lack of a sufficient number of studies explaining these changes has been reported.

Keywords: high-pressure processing; pascalisation; foodborne pathogens; non-thermal; *Listeria monocytogenes*

check for updates

Citation: Wiśniewski, P.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A. Impact of High-Pressure Processing (HPP) on *Listeria monocytogenes*—An Overview of Challenges and Responses. *Foods* **2024**, *13*, 14. https://doi.org/10.3390/foods13010014

Academic Editor: Joana Campos

Received: 3 December 2023
Revised: 12 December 2023
Accepted: 18 December 2023
Published: 19 December 2023

Copyright: © 2023 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

High-pressure technology (HPP) is a low-temperature treatment of food to improve its microbiological safety by inactivating pathogenic microorganisms while minimally affecting the nutritional, functional, and/or sensory properties of food products undergoing preservation [1,2]. The technology is applied to products where other food processing technologies (including heat treatment) negatively impact their quality and appearance relative to the raw material [3]. According to industry data, the use of HPP technology is increasing in both the US and EU countries [4]. One of the main drawbacks limiting the widespread availability of HPP equipment is its high cost, ranging from EUR 500,000 to EUR 3,500,000 [5]. Currently, a variety of HPP products such as fruit juices, packaged vegetables, meat, and RTE meat products, as well as dairy products and seafood, are available at retail [6–9]. During fixation using HPP, the most common pressures used are 100–600 MPa, with different operating times (a few–several minutes) at room temperature (or lower), in flexible packaging, using a liquid medium responsible for pressure transfer [10].

One of the most dangerous food pathogens isolated from various foods is *Listeria monocytogenes* [11]. Due to its virulence and ability to spread in the environment, *L. monocytogenes*

is one of the main threats to safe food production [12]. The extent of induced changes, damage, and/or cell death of *L. monocytogenes* under the influence of HPP technology depends on several factors, among which are the parameters of the process (pressure value, time of treatment), the type of food matrix, and the presence of antibacterial compounds [9]. Some of the injuries caused by HPP technology within cells may be reversible during the storage of food products. This can affect the re-growth of microorganisms, resulting in food spoilage or the induction of foodborne diseases [13].

Environmental stress induced by HPP directly affects changes not only in the pathogen's cell structure, but also within the cell's genome, which consequently translates into changes in the cell's pathogenicity—including changes in virulence, antibiotic resistance, and the expression of genes encoding these resistances [10,14,15]. There are few studies on the effect of HPP treatment-dependent factors (pressure, operating time, temperature) and food matrix (water activity, pH, moisture content, fat content, NaCl content) on reducing *L. monocytogenes* in various food products [16–18]. Most studies on HPP treatment focus on the effectiveness of HPP against pathogen cell inactivation while maintaining food product quality [19]. This review highlights the lack of sufficient studies explaining antibiotic resistance, virulence, and the expression of antibiotic resistance and virulence genes in *L. monocytogenes* cells that survive HPP treatment, as well as explaining the potential for *L. monocytogenes* cell recovery during storage. Knowledge related to both the pathogen itself and the impact of HPP on *L. monocytogenes* should continue to expand to improve industrial applications of HPP treatment, inactivate *L. monocytogenes* and, consequently, produce safe food.

2. *Listeria monocytogenes*—A Virulent, Psychrotrophic Foodborne Pathogen

The occurrence of pathogenic microorganisms in food is well-known. Through their occurrence in food, they can contribute to causing various foodborne diseases [20]. Among the group of the most dangerous pathogens that pose a threat to public health and the food industry is *L. monocytogenes* [21]. These microorganisms are isolated from water, soil, wastewater, vegetation, fish, birds, and mammals, and thus, also from food [22,23]. Their ability to survive adverse environmental conditions is determined by the ubiquity of *L. monocytogenes* in the environment. Food is considered the main source of *L. monocytogenes*—including, for example, raw and smoked fish, meat products, unpasteurized dairy products, fruits, vegetables (including frozen vegetables), seeds, and spices, as well as ready-to-eat (RTE) products [24].

L. monocytogenes is a heterogeneous species comprising 13 serotypes, which can be divided into four genetic groups. Serotypes 1/2b, 3b, 4b, 4d, and 4e belong to group I, while serotypes 1/2a, 1/2c, 3a, and 3c are included in group II. Serotypes 4a and 4c belong to group III and are rarely isolated from humans. Serotypes 1/2a and 1/2b are most often isolated from food, while 4b is isolated from clinical cases [25]. According to European Commission Regulation (EC) No. 2073/15 November 2005 [26], *L. monocytogenes* is considered one of the criteria for food safety. Its occurrence should be monitored in products where its growth is possible before these products enter the market. In such products, *L. monocytogenes* should not be present in 25 g (25 mL) of a sample. Additionally, throughout a product's shelf life, the number of these bacteria in a sample must not exceed 100 CFU/g (CFU/mL) of the product, regardless of whether the product favours or does not favour the growth of these bacteria. Food testing is usually limited to detecting the presence or determining the number of this pathogen, and omits testing for, among other things, determining growth after storage, which is particularly important because of the possibilities associated with the growth of *L. monocytogenes* during storage.

2.1. *Listeria monocytogenes*—Virulence Factors

L. monocytogenes has a whole range of mechanisms that directly affect its pathogenicity (virulence). The pathogenicity mechanism of *L. monocytogenes* is a complex process with two main phases: (I) the intestinal phase that involves the initial bacterial colonisation in

the intestine and the penetration through the mucosal barrier into the bloodstream or the lymphatic system in order to spread throughout the body; and (II) the systemic spread phase, during which dendritic cells or macrophages transport bacterial cells to the spleen, lymph nodes, the liver, the brain, and the placenta (in pregnant women) [27]. A variety of virulence factors are involved in particular stages of the pathogenesis process, including protein regulatory factor (PrfA), sigma B factors (σ^B), adhesion proteins, epithelial cell invasion factors, factors responsible for vacuole lysis, factors responsible for cell-to-cell spread, and other unclassified factors (Table 1) [27,28].

Table 1. *Listeria monocytogenes* virulence factors and their function.

	Virulence Factors	Protein/Gene	Function
	Protein Regulatory Factor	PrfA	Regulator of expression of many virulence proteins
	Sigma B	σ^B	Regulation of stress and virulence genes
Adhesion Proteins	*Listeria* adhesion protein	LAP	Adhesion to intestinal epithelial cells; disruption of intestinal epithelial barrier
	Listeria adhesion protein B	LapB	Adhesion and invasion into host cells
	Autolysin amidase	Ami	Adhesion to hepatocytes
	Fibronectin binding protein	FbpA	Adhesion to cells and serves as a chaperone to stabilise and secrete LLO, InlB
	Internalin J	InlJ	Adhesion to epithelial cells and binds to human intestinal mucin-2 (MUC2)
	Internalin F	InlF	The crossing of blood–brain barrier
	Autolysin IspC	-	Adhesion to non-phagocytic cells
	Lmo1656	-	Transcytosis in goblet cells
Invasion	Internalin	InlA	Promotes bacterial internalisation into enterocytes and bacterial transcytosis across the intestinal barrier
	Internalin B	InlB	Acts in the invasion of enterocytes and passage through M-cells of Peyer's patches
	Virulence invasion protein	Vip	Invasion of epithelial cells
	LAP	-	Induces junctional protein dysregulation and increases epithelial permeability (translocation)
Lysis of vacuole	Listeriolysin (LLO)	*hlyA*	A haemolysin helps bacteria escape from the phagosome inside the cell by disrupting the vacuolar membrane
	Phospholipase	(*plcA*–PI-PLC; *plcB*–PC-PLC)	Lyses of vacuole membrane
Cell-to-cell spread	Actin polymerisation protein	ActA	Nucleation of actin tail for bacterial movement inside the cytoplasm
	PC-PLC	-	Lyses of vacuole membrane
	Metalloprotease	Mpl	Helps synthesis of PLC
Miscellaneous	P60 (cell wall hydrolase)	-	Adhesion/invasion
	Bile salt hydrolase	BSH	Survival in gut
	Fructose-1,6- bisphosphate aldolase	FAB	Moonlighting protein: (i) adhesion to the host's cells and (ii) role in the pathogenesis
	Internalin C	InlC	Perturbs apical cell junctions
	Internalin H (InlH)	InlH	Contributes to systemic listeriosis
	Autolysin amidase	Ami	Bacteriolysin: enhances the host immune response
	LAP	-	Upregulates TNF-a and IL-6 expression in intestinal cells
	Listeriolysin (LLO)	*hlyA*	Induces lymphocyte apoptosis and suppresses proinflammatory cytokines
	Listeria nuclear-targeted protein A	IntA	Decreases the host's immune response
	Listeriolysin S	-	Haemolytic and cytotoxic; bacteriocin (bactericidal)

Compiled from Bhunia (2018) [27] and Lopes-Luz et al., (2021) [28].

The various virulence factors are encoded by their corresponding genes, and their role in the pathogenicity process depends on their expression [29]. To date, four pathogenicity islands have been identified, defined as Listeria Pathogenicity Islands (LIPIs). The typical genetic organization of LIPIs includes the islands LIPI-1, LIPI-2, LIPI-3, and LIPI-4 [29]. Each island encodes a different set of genes. LIPI-1 consists of six genes (*prfA*, *actA*, *hly*, *mpl*, *iap*, *plcA, and plcB*) and is essential for intracellular survival and cell proliferation. LIPI-2 is a 22 kb cluster of genes responsible for phagosome degradation. LIPI-3 consists of eight genes (*llsA*, *llsG*, *llsH*, *llsX*, *llsB*, *llsY*, *llsD*, *llsP*) encoding a biosynthetic cluster involved in Listeriolysin S (LLS) production. The last, LIPI-4, is a cluster that includes six genes (*GlvA*, *Gat-pr*, *YdjC*, *GatA*, *GatB*, *GatC*) involved in neuronal and placental infection [30–34].

In addition to the presence of different virulence-encoding genes, ongoing research indicates that *L. monocytogenes* possesses mechanisms for surviving adverse environmental conditions. One such mechanism is the ability of *L. monocytogenes* to enter a viable but non-culturable (VBNC) state in which the cells retain their biological activity. Nutrient loss has been demonstrated to be the primary trigger for cultured cells to enter the VBNC state [35,36]. However, salinity, temperature change, low environmental pH, chlorine-induced stress, or exposure to sunlight may also play an important role in triggering the VBNC state in *L. monocytogenes* [37–39]. Pathogenic microorganisms in the VBNC state may pose a potential hazard to food safety due to the retention of their cellular integrity and ability to express genes, which in many cases is much stronger than that of cultured cells [40]. There is, therefore, a risk that *L. monocytogenes* bacteria will not be detected at the production facility when using traditional microbial culture techniques and will be present in the VBNC state in food, with the result that the pathogen levels will increase and may contribute to causing diseases in people consuming such contaminated food. It is therefore necessary to undertake new research in order to understand the actual risk associated with the occurrence of *L. monocytogenes* in the VBNC state in RTE-type foods, as well as the virulence of this pathogen [21].

2.2. Listeriosis

L. monocytogenes is responsible for causing listeriosis—a zoonosis characterized by a very severe course, especially in people in the so-called high-risk group, which includes the elderly, pregnant women, newborns, and immunocompromised people [25]. Listeriosis is characterized by a severe course (meningitis, endocarditis and encephalitis, sepsis, miscarriages, stillbirths) and a high mortality rate of 20–30% [41,42].

In the treatment of listeriosis, antibiotics are used to inhibit the infection caused by *L. monocytogenes*. This bacterium is considered sensitive to a broad spectrum of antibiotics that exhibit bactericidal activity against Gram-positive bacteria—including tetracyclines, ampicillin, penicillin G, imipenem, amoxicillin, sulphonamides, aminoglycosides, macrolides, chloramphenicol, and glycopeptides [43]. Despite this, most *L. monocytogenes* strains show native resistance to cefotaxime, cefepime, fosfomycin, oxacillin, and lincosamides [44]. In the literature, information is encountered regarding the occurrence of natural resistance to fosfomycin, third-generation cephalosporins, and first-generation quinolones [45]. Resistance to tetracyclines is considered the most common antibiotic resistance trait in *L. monocytogenes* isolated from humans and food. Six classes of tetracycline resistance genes (*tet*K, *tet*L, *tet*M, *tet*O, *tet*P, and *tet*S) have been described in Gram-positive bacteria. However, only *tet*S, *tet*M, and *tet*L have been identified in *L. monocytogenes*. The study also found that strains isolated from dairy farms had more than one antibiotic resistance gene sequence in their genome. A high frequency of the *flo*R (66%), *pen*A (37%), *str*A (34%), *tet*A (32%), and *sul*I (16%) genes was found in a large number of *L. monocytogenes* strains isolated from food, although the other tetracycline resistance genes (*tet*E, *tet*C, *tet*B, *tet*D, and *tet*G) and other antibiotic resistance genes (*van*A, *van*B, *aad*A, *cml*A, *ere*B, *ere*A, *str*B, *sul*I, *amp*C, and *erm*B) were not detected in *L. monocytogenes* [44,46]. Researchers report that *L. monocytogenes* isolated from different foods show the presence of the following genes: *tet*M [47]; *erm*B, *tet*M, *dfr*D [48], *tet*A, *lmr*B, *mec*C, *msr*A, and *fos*X [49]; *erm*B [50]; and *Lde*,

aadB, *mefA*, *lnuA*, *sulI*, and *sulII* [11]. Resistance to tetracyclines and other antibiotics in *L. monocytogenes* is mainly caused by conjugation plasmids and transposons from *Enterococcus* sp., *Streptococcus* sp., and other *Listeria* sp. [44]. Although most strains within a species show high susceptibility to antibiotics, the massive use of antibiotics in human and animal medicine leads to the exposure of microbial strains to sub-therapeutic concentrations of antibiotics [51], which promotes the development of resistance in these pathogens and the activation of stress response mechanisms, including the activation of "silent" antibiotic resistance genes. Cross-resistance has also been observed in *L. monocytogenes*, with the result that the strains that have developed resistance to benzalkonium chloride (a component of disinfectants often used in the food industry) are also resistant to ciprofloxacin due to the efflux pump activity [52,53]. *L. monocytogenes* poses an ongoing threat to the food industry, particularly at facilities producing RTE-type foods [11]. In recent years, there has been a steady increase in antibiotic resistance among *L. monocytogenes* strains isolated from food and food production environments (especially for the antibiotics used to treat listeriosis), and it is, therefore, necessary to monitor changes with regard to the antibiotic resistance of *L. monocytogene*s strains isolated from food and the emergence of multi-resistant strains [11,44,51,54–62].

2.3. Food-Related Outbreaks Caused by Listeria monocytogenes

Listeriosis was the fifth most frequently reported zoonotic disease in humans in the EU in 2021. The prevalence of *L. monocytogenes* was different depending on the food category and sampling stage. Overall, the prevalence remained at a low level in RTE foods. The highest values were observed for fish and fishery products (3.5–5.4%), meat products of beef or pork origin (2.7–3.9%), fruits and vegetables (2.5%), and hard cheeses made from raw or low-heat-treated sheep's milk (4.6%). As in previous years, the highest percentage of positive samples for *L. monocytogenes* was observed at the production stage compared to the distribution stage [63].

Recently, many listeriosis outbreaks have been transmitted by many different types of food worldwide—in Europe [64–68], USA [69–84] Africa [85], and Australia [86] (Table 2). The most recently documented case of an outbreak of listeriosis took place in two US states, namely Florida and Ohio, and was associated with the consumption of Big Olaf brand ice cream [81]. Twenty-three cases of listeriosis were then noted, of which 22 were hospitalised (with one death noted). The summarised data indicate the need for the continuous monitoring of food of both animal and plant origin for the occurrence of *L. monocytogenes*.

Table 2. Selected *L. monocytogenes* outbreak infection cases around the world (2009–2022).

	Year (Period)	Country (City, State)	Source	No. of Cases	Reported Deaths	Reference
Europe	2009–2012	Portugal	Cheese	30	11	[64]
	2015–2018	Austria, Denmark, Finland, Sweden, the UK	Frozen corn	41	6	[66]
	2015	Denmark, Germany, France	RTE salmon products	12	4	[65]
	2014–2019	Denmark, Estonia, Finland, France, Sweden	Cold-smoked fish products	22	5	[67]
	2017–2019	Netherlands, Belgium	RTE meat products	21	3	[67]
	2019	Spain	Chilled roasted pork meat product	222	3	[68]

Table 2. *Cont.*

	Year (Period)	Country (City, State)	Source	No. of Cases	Reported Deaths	Reference
USA	2010–2015	Four states	Ice cream	10	3	[71]
	2014	Multi-states	Mung bean sprouts	5	2	[70]
	2014		Stone fruit	4	0	[83]
	2014–2015	Twelve states	Caramel apples	35	7	[69]
	2015–2016	Two states	Packaged leafy green salads	23	1	[84]
	2015	10	Soft cheeses	30	3	[75]
	2016	2	Raw milk	2	1	[73]
	2016	4	Frozen vegetables	9	3	[74]
	2016	9	Packaged salads	19	1	[72]
	2017	4	Soft, raw-milk cheese	8	2	[76]
	2019	5	Hard-boiled eggs	8	1	[77]
	2020	4	Deli meats	12	1	[79]
	2020	Seventeen states	Enoki mushroom	36	4	[78]
	2021	Two states	Frozen fully cooked chicken products	3	1	[80]
	2022	11	Ice cream	28	1	[81]
	2022	8	Packaged salads	10	1	[82]
Africa	2017–2018	Republic of South Africa	RTE processed meat products	1024	200	[85]
Australia	2018	Australia (New South Wales, Victoria, Queensland, Tasmania)	Rockmelons	20	7	[86]

Compiled from Wiktorczyk-Kapischke et al., (2023) [12] and Kaptchouang Tchatchouang et al., (2020) [87].

3. High-Pressure Processing—Potential Food Safety Risks

Nowadays, in response to increasing consumer demand for high-quality, ready-to-eat (RTE) products that are microbiologically safe while maintaining unchanged quality characteristics (nutritional and organoleptic value), the food industry is striving to find new food processing technologies aimed at producing products with minimally altered quality characteristics, a long shelf life, and no preservatives [88]. High-pressure processing is experiencing tremendous development in food preservation processes and is one of the most promising non-thermal methods of food preservation. HPP is a commercial technology used to extend the shelf life of many different types of food: liquid products, such as juices, fruit and vegetable purees, and guacamole; and meat products, including ready-to-eat sliced deli meat, hot dogs, dry-cured meat products, shellfish, ready-to-eat products, dips, wet salads, pureed baby foods, and dairy products [63]. Products preserved using this technology are required to be stored at a temperature below 7 °C in case of storage and distribution, with a shelf life (depending on the product) ranging from a few days to a few weeks [63,89]. It is one of the most promising non-thermal methods of food preservation that does not contribute to causing rapid changes in food degradation. Pascalisation also affects microorganisms—in the case of vegetative microorganisms, this technology is not able to meet all the challenges posed to it. Despite the recognition of pascalisation as an effective technology that produces safe, high-quality food, there are still many issues associated with the potential safety risks of using HPP [90]. These include the following issues:

- The control of surviving microbial spores (e.g., with refrigerated storage or additives) and HPP-induced spore activation (with subsequent conversion to vegetative cells);
- The induction of sub-lethal damage in cells, including the transformation of cells into a viable but non-culturable state (VBNC) (this can lead to the overestimation of HPP efficacy via routine detection methods);
- The induction of pathogenicity (virulence), gene expression (virulence, antibiotic resistance, and others), and cross-resistance to other stresses [91].

3.1. Determinants of the Effect of HPP Treatment on Listeria monocytogenes

L. monocytogenes exhibits resistance to many different environmental conditions [92]. In addition to inactivating pathogens found in food [93,94], the interactions that occur during food preservation using high pressures induce structural, morphological, physiological, and genetic changes, as well as damage to the pathogen cells directly [9]. The susceptibility of *L. monocytogenes* to HPP-induced stress factors, and thus the associated survivability of the pathogen, is determined by a number of different factors, of which the main ones include the HPP treatment parameters, namely the process temperature, pressure level applied, process duration, food matrix type, individual characteristics of strains, and their initial count (Table 3) [10,14,55,60,95–113]. Research results also point to synergistic interactions between HPP and other food preservation methods or the addition of substances with a beneficial bactericidal effect that may contribute to a more effective reduction in the *L. monocytogenes* population, even to microbiologically safe levels [60,103]. Differences have also been noted in the determination of *L. monocytogenes* count following HPP, depending on the growth medium used [100,102].

Table 3. Reduction in *L. monocytogenes* populations by HPP in food, and growth mediums.

No.	Strains	HPP			Reduction in Population (log CFU/g or log CFU/mL)	Food/Medium	Reference
		Pressure (MPa)	Time (min)	Temp. (°C)			
1	One strain	100	3	12	NE	Tryptic soy broth (TSB)	[55]
		200					
		300			1.49		
		400			BD		
2	One strain	200	10	20	NE	pH 5.6 citrate buffer	[95]
		300					
		400			BD		
3	Cocktail of 5 strains	200	5, 10, 15, 20	20, 40	NE	Queso Fresco (QF) cheese	[99]
		400			~1.78-BD		
		600			BD		
4	Cocktail of 2 strains	200	8	8	NE	TSBYE	[14]
		400			5.78 and 7.04		
5	Cocktail of 5 strains	200	10	25	NE (I, II, III)	UHT milk (I) Mozzarella (II) Smoked salmon (III)	[103]
		300					
		400			3.00–4.00 (I, II); NE (III)		
		500			BD (I, II) 1.50 (III)		
6	Cocktail of 9 strains	250	5	30	3.90–4.34	Pasteurized fruit juices (apple, apricot, cherry, and orange)	[96]
		350		25	0.92–3.53		
				40	8.20–8.70		
				50	7.78–8.04		

Table 3. *Cont.*

No.	Strains	HPP			Reduction in Population (log CFU/g or log CFU/mL)	Food/Medium	Reference
		Pressure (MPa)	Time (min)	Temp. (°C)			
7	Cocktail of 14 strains	300	5	10	0.00–2.76	TSBYE	[100]
		400			0.06–6.31		
		500			0.75–7.23		
8	Two strains	300	10	5, 20	NE	Cheeses	[97]
		400			2.97 and 1.57		
		500			5.00		
9	Two strains	300	5	6	NE	Commercial free-starter fresh cheese	[102]
		400					
		500			BD $^{-}$ and BD $^{+}$ 1.50 $^{-}$ and 2.00 $^{+}$		
		600			BD $^{-}$ and BD $^{+}$ 3.90 $^{-}$ and 4.30 $^{+}$		
10	Cocktail of 4 strains	350	10	25	~2.00	Camembert cheese	[104]
		450			>5.00		
		550					
11	One strain	400	5	35	>5.00	Apple cubes	[106]
12	Cocktail of 10 strains	400	1	20	0.05–2.07	TSBYE	[10]
		600			5.42–8.27		
13	Cocktail of 5 strains	400–800	3	20	2.00-BD	Meat simulation medium	[108]
14	One strain	400	15	20	4.00 $^{-}$ and 6.70 $^{+}$	UHT milk	[109]
		500					
		550			4.00 $^{-}$ and 7.00 $^{+}$		
		600					
15	Cocktail of 5 strains	400	1, 3, 5	18	1.42 (1 min)	Raw milk	[105]
		500			5.48 (5 min)		
		600			5.65 (3 min) 5.91 (5 min)		
16	Cocktail of 5 strains	400	10	15	≥8.00	Brain-heart infusion (BHI)	[110]
		600					
		900	5				
17	One strain	450	15	21	≥7.91	Human milk	[111]
18	Cocktail of 2 strains	450	10	16	0.80	Sliced dry ham	[112]
		600	5		1.30 and 1.50		
19	Cocktail of 7 strains	593	3	4	≥6.00	Coconut water	[113]
20	Cocktail of 5 strains	500	2, 5, 7	4	3.90 (2 min) ≥6.50 (7 min)	Raw beef	[60]
21	Cocktail of 4 strains	600	8	16	2.47 (DCS); 2.13 (DCL)	Dry-cured salchichón (DCS) and dry-cured loin (DCL)	[107]
22	Cocktail of 13 strains	600	2	20	5.64-BD	Cooked chicken	[98]
23	Cocktail of 4 strains	600	3	4	≥7.50	Cooked pork sausage	[101]

NE—treatment not enough to reduce the population of *L. monocytogenes* strains; BD—reduction in the *L. monocytogenes* population to below detection levels; $^{-}$—initial inoculation value at the level of 3–4 log CFU/g; $^{+}$—initial inoculation value at the level of 6–7 log CFU/g; TSBYE—Tryptic soy broth with 0.6% *w*/*v* yeast extract.

3.1.1. HPP Treatment Parameters

This study indicates the effectiveness of different combinations of HPP treatment parameters in terms of the pressure (350–600 MPa), duration of treatment (1–20 min), and process temperature (4–40 °C), depending on the matrix/food, the initial *L. monocytogenes* population size, or the specific characteristics of the tested strain/cocktail of strains. The combination of these parameters/characteristics is important in terms of reducing the population to an appropriate level of safety. Researchers have indicated the lower pressure value and/or the duration of HPP treatment needed to inactivate *L. monocytogenes*, as compared to, e.g., *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [89]. With the same values of the duration of treatment and the temperature of the HPP treatment, increasing the pressure value tends to increase the level of reduction in the initial microbial count [114]. In most of the studies cited in Table 3, increasing the value of one of the HPP treatment parameters (pressure, duration of treatment, or process temperature) directly increased the reduction in the *L. monocytogenes* population to a microbiologically safe level (reduction > 5 log CFU/g (CFU/mL)), or ensured a level of reduction that prevented the detection of the pathogen via the culture methods employed in the study. In some of them, the level of reduction following an increase in one of the process parameters increased to a level that did not guarantee microbiological safety [95,97,99,102,103,112].

The literature provides information on the effectiveness of pressure parameters in relation to reductions in *L. monocytogenes*. In general, the application of a pressure > 400 MPa in most cases has the effect of reducing the initial population below the detection level, thus ensuring the microbiological safety of food (regardless of the time and temperature of the HPP treatment) (Table 3).

The process duration has a significant effect on the effectiveness of HPP. Park et al., (2022) [60] analysed the effectiveness of HPP (500 MPa, 4 °C) against a cocktail of six *L. monocytogenes* strains in raw beef in three time variants (2, 5, and 7 min). The study showed an increase in the degree of reduction from 3.90 log CFU/g over 2 min to ≥6.50 log CFU/g over 7 min. An increase in the degree of reduction, dependent on the duration of HPP, was observed in a study by Stratakos et al., (2021) [105]. The researchers analysed the effect of HPP (400, 500, and 600 MPa; 18 °C) on the effectiveness of reducing a cocktail of five *L. monocytogenes* strains in raw milk over 1, 3, and 5 min. The researchers observed an increase in the degree of reduction with increasing storage time; however, this effect was not significant, as the reduction increased from 5.65 log CFU/g (3 min) to 5.91 log CFU/g (5 min). This study also observed that the effectiveness of the use of a pressure of 500 MPa and a duration of 5 min in the reduction in *L. monocytogen*es was similar to that when using parameters of 600 MPa/3 min. On the other hand, a study by Alpas and Bozoglu (2002) [96] observed different levels of reduction in a cocktail of five *L. monocytogenes* strains depending on the process temperature (25, 40, and 50 °C), with the ranges of 0.92–3.53, 8.20–8.70, and 7.78–8.04 CFU/mL, respectively (depending on the juice type used), which indicates the direct effect of the process temperature on the effectiveness of pathogen reduction.

The conditions under which the HPP treatment is carried out should be selected in such a manner so as to ensure the microbiological safety of food and thus not contribute to the deterioration of its quality characteristics. In certain cases, a positive reduction in the population to the desired safety-ensuring level resulted in a deterioration of the quality characteristics of the product. Batty et al., (2019) [104] analysed the effect of HPP technology on the survivability of *L. monocytogenes* with the simultaneous effect of this technology on the sensory characteristics of a Camembert-type cheese. Although the parameters applied in this study (450 MPa/10 min and 550 MPa/10 min) contributed to a reduction in *L. monocytogenes* > 5 log CFU/g, there was a deterioration in the quality and appearance of the product that would not be acceptable to consumers.

3.1.2. Food Matrix

The type of food matrix also affects the effectiveness of the HPP treatment. As regards the properties of the test matrix, it was reported that certain food components (proteins,

fats, carbohydrates, lipids) might have an effect in reducing the efficiency of HPP, which means that the results regarding the reduction in the microbial population in experiments carried out using growth mediums cannot be directly applied to the actual conditions occurring during food preservation [114].

In a study on cheeses by Evert-Arriagada et al., (2018) [102], the authors observed a reduction in *L. monocytogenes* count by approx. 5–6 log CFU/g following treatment at 500 MPa; however, at a lower treatment (300 MPa), the resulting reduction amounted to only 0.7 log CFU/g. Similar results were obtained by Hnosko et al., (2012) [115] and Tomasula et al., (2014) [99] in the "Queso Fresco" cheese. Tomasula et al., (2014) [99] observed that the HPP treatment under a pressure of 600 MPa for 20 min at 20 °C was effective at reducing in the population of a cocktail of five *L. monocytogenes* strains inoculated on the surface or in the curd of Queso Fresco cheese slices. The potential for regeneration and growth was observed after 7 and 28 days, respectively. The authors believe that microstructural changes in the cheese matrix, induced by HPP, triggered the gradual aggregation of the protein matrix, accompanied by a loss of whey, which increased the resistance of *L. monocytogenes* to HPP in a manner similar to that of low water activity [116,117]. Some authors attributed these results to the level of fat used in cheese production due to its baroprotective effect [118]. Similar microstructural changes in a cheese matrix induced by HPP were previously described for a fresh cheese subjected to a pressure of 500 MPa for 5 min under industrial conditions [119].

The effectiveness of HPP is also determined by the type (consistency) of the product. A study conducted by Misiou et al., (2018) [103] to assess, e.g., the survivability of *L. monocytogenes* strains in three different food matrices critical to this microorganism (UHT milk, mozzarella cheese, smoked salmon) indicated a reduction to a safe level of the microorganism occurrence in all food matrices except smoked salmon, ensuring a reduction by only 1.50 log CFU/g (500 MPa, 10 min, 25 °C), while in the other matrices (with the same HPP treatment parameters), the population of *L. monocytogenes* decreased to a level below detection via the methods applied.

The choice of growth medium for carrying out experiments has an effect on the effectiveness of reduction under the influence of HPP (Table 3). More enriched mediums, such as TSBYE (Tryptic soya broth with 0.6% yeast extract), may have a diminished effect on the reduction in the *L. monocytogenes* population than TSB (Tryptic soya broth) alone or BHI (Brain-heart infusion). At pressures >400 MPa, differences are observed in the population reduction level due to the fact that enriched mediums such as TSBYE will allow a higher initial level of *L. monocytogenes* to be obtained, and it is well known that the effectiveness of HPP is also determined by the initial pathogen occurrence level [14]. For this reason, it is important to consider the effect of the specific matrix on the effectiveness of the HPP treatment in the planned research.

3.1.3. Individual Characteristics of Strains

The effectiveness of HPP treatment is determined by numerous properties, including the individual characteristics of test strains. Perez-Baltar et al., (2021) [112] investigated the survivability of two selected *L. monocytogenes* strains following exposure to HPP in sliced dry-cured ham and during storage in a refrigerator. The *L. monocytogenes* strains S2 and S7-2 exhibited moderate resistance to HPP (450 MPa for 10 min—a reduction by 0.80 log CFU/g; 600 MPa for 5 min—a reduction by 1.30 and 1.50 log CFU/g, respectively) in a sliced dried ham with a low a_w value of 0.88. Brusch et al., (2017) [100], similar to the few previously conducted studies, used a greater set of strains, i.e., 14 *L. monocytogenes* strains. The strains were isolated from food and of clinical origin and characterised by different phenotypic and genetic features. The authors of the study also observed a considerable intra-strain variability in pressure resistance among the tested strains. Overall, all the strains were able to survive treatments under pressures of 300, 400, and 500 MPa, with a loss of viability (in log cycles) ranging from 0.00 to 2.76, from 0.06 to 6.31, and from 0.75 to 7.23, respectively. The application of a pressure of 500 MPa was sufficient to reduce the viability of all the

strains by more than five log cycles, except a single strain isolated from a fermented sausage (a reduction by <1.00 log CFU/g). The researchers also observed that antibiotic-resistant *L. monocytogenes* strains exhibited a higher survivability level following the application of a pressure of 400 MPa [100].

The exposure of *L. monocytogenes* strains representing different phenotypes and genotypes to different parameters and the food matrix indicates a high variability of their survivability. The use of *L. monocytogenes* strains exhibiting different resistance to pressure in the study is crucial in guaranteeing that the number of cells in food products subjected to HPP will decrease to an appropriate level, as well as the indication of optimal process parameters in order to ensure adequate food safety [100,102].

3.1.4. Addition of Antibacterial Agents

In order to increase the effectiveness of HPP treatment, it is possible to use antimicrobial agents or essential oils in combination with HPP. Depending on the antimicrobial agent used, the synergistic effect may be either low or high. The literature provides a few reports indicating the possibility of a synergistic effect of HPP technology along with other methods contributing to a reduction in *L. monocytogenes* immediately following the treatment, and those contributing to the impairment of the pathogen's regenerability during storage [98,100,103,106,111].

Certain studies focused on the addition of a substance/strain with documented anti-listeria properties [98,100,103]. A study conducted by Bruschi et al., (2017) [100] showed that the exposure of *L. monocytogenes* strains representing different phenotypes and genotypes to different hydrostatic pressures demonstrated a high variability in their survivability. This study also investigated a combination of HPP preservation with an anti-listeria pediocin bacHA-6111-2 produced by *Pediococcus acidilactici* HA-6111-2. The study showed that this bacteriocin could be used as a natural agent to prevent the reversal of cellular damage during the storage of products subjected to HPP. On the other hand, in a study by Misiou et al., (2018) [103], the authors investigated the effectiveness of a combination of endolysin PlyP825 and HPP against a cocktail of *L. monocytogenes* strains in selected food products (i.e., milk, mozzarella cheese, and smoked salmon). The authors demonstrated that the effectiveness of the combination of these methods was determined by the food type, yet it showed greater effectiveness than HPP alone. This study indicated that the application of PlyP825 enabled the elimination of several different *L. monocytogenes* strains from food at reduced levels of the HPP pressures applied. Patterson et al. (2011) [98] investigated the synergistic effect of HPP in combination with the pressure-resistant *Weissella viridescens* strain and HPP in combination with sodium lactate on the survival and regenerability of *L. monocytogenes* during storage. In their study, the researchers demonstrated the ability to reduce cell growth as a result of the addition of a *W. viridescens* strain (extension of the detection limit from 7 days to 21 days). Sodium lactate alone did not significantly inhibit the growth of *L. monocytogenes*; however, in combination with HPP, it proved to be the most effective of all the tested agents in inhibiting the pathogen's growth, even during prolonged storage at 8 °C (below the detection level up to day 105 of storage).

The application of coatings and the combination of a few different preservation methods have also yielded satisfactory results in reducing the *L. monocytogenes* population. Bambace et al., (2021) [106] investigated the effect of HPP on reducing *L. monocytogenes* in combination with the application of an alginate–vanillin coating in ready-to-eat apple cubes. The study observed a decrease in the *L. monocytogenes* cell count below the detection level in each case (following HPP and following a combination of HPP and the coating applied). Interestingly, in the case of *E. coli*, the application of a coating increased the level of population reduction, as compared to the use of HPP treatment alone (from 8.02 log CFU/g to 2.61 log CFU/g). On the other hand, a study by Jarzynka et al., (2021) [111] assessed the potential for the growth of such pathogens as *L. monocytogenes* following the application of two methods combined, i.e., HPP and freeze-drying, for the preservation of donor milk. The authors report that both HPP alone and the combination of these two methods reduced

the *L. monocytogenes* count below the detection level (a reduction of 7.91 log CFU/mL), even after six months of storage.

3.2. Recovery of Cells during Storage after HPP

The control of pathogenic bacteria is possible thanks to advances in the development of antimicrobial agents and the provision of proper hygienic conditions during food production. However, this "fight" continues due to the adaptability of microorganisms to changing environmental conditions as a result of intra-strain and intra-species transformations, leading to their production of certain defence mechanisms. One such mechanism which is receiving increasing attention is the ability of cells to enter a "dormant" state related to a "viable but not-culturable" (VBNC) state [120]. The VBNC state is one of the survival strategies adopted by many microbial species when exposed to extreme environmental stress conditions. This state resembles microbial "dormancy", as these cells are not able to grow on solid growth mediums while retaining their metabolic activity, expression of toxic proteins, and increased tolerance to antimicrobial agents (including antibiotics) [120,121]. The inability to use the commonly employed culture methods to determine cells in the VBNC state is a major impediment in experimental studies concerning, e.g., increased antibiotic resistance, and hinders the effective assessment of the control of cells in this state [120]. Currently, more than 100 microbial species are able to enter the VBNC state. There are scientific reports in the literature relating to the fact that cells in the VBNC state can produce biological toxins (through the presence of toxin-encoding genes). Cells in this state may show a higher expression of specific genes as compared to cultured cells [122,123]. In addition, cells in the VBNC state can return to a viable state under favourable environmental conditions. All the above-mentioned arguments indicate that pathogens in the VBNC state pose a serious hazard to the microbiological safety of food and, consequently, to human health [20]. VBNC cells have different morphological characteristics than cultured cells, as the cross-linking of peptidoglycan in the cell wall is denser, the composition of lipids in the cytoplasmatic membranes is different, and metabolism is reduced, allowing them to remain in this state for a long time, even for several months. They are able to retain their pathogenic potential despite the considerably reduced metabolism and, under favourable conditions, can revert to vegetative forms while retaining an increased pathogenicity level [124].

A few previously conducted studies showed the presence of sub-lethally damaged *L. monocytogenes* cells capable of regenerating following HPP and growing during storage (even under refrigeration) [13,99,101,108,110,113,125–127]. In certain studies, immediately after HPP, no presence of *L. monocytogenes* cells was noted. However, with increasing storage time, the cells regenerated and grew, which suggests possibilities relating to the transition of *L. monocytogenes* to the VBNC state. These observations were made following the application of HPP in many combinations of pressure (200–600 MPa), time (3–30 min), temperature (4–45 °C), and the storage duration and temperature (14–75 days; 4–37 °C) for both food products and growth mediums (Table 4).

Table 4. Possibilities of recovery of *L. monocytogenes* after HPP in food, and growth mediums.

No.	Strains	HPP			Storage Analyses			Food/Medium	Reference
		Pressure (MPa)	Time (min)	Temp. (°C)	Time (Days)	Temp. (°C)	Recovery/Presence of Damaged Cells		
1	Cocktail of 5 strains	200 400 600	5, 10, 15, 20	20, 40	60 (0, 7, 14, 28, 42, 60) *	4, 10	(+) ≥42 day recovery	Queso Fresco cheese (QF)	[99]
2	One strain	200–500	1, 3, 5, 10, 20, 30	22 ± 2	30 (10, 20, 30) *	20 37	(+) (–)	Medium	[126]

Table 4. *Cont.*

No.	Strains	HPP			Storage Analyses			Food/Medium	Reference
		Pressure (MPa)	Time (min)	Temp. (°C)	Time (Days)	Temp. (°C)	Recovery/Presence of Damaged Cells		
3	One strain	350	10	45	28 (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 20, 26, 28) *	4	>6 day (+)	UHT milk	[13]
		450				22	>1 day (+)		
		550				30			
4	Cocktail of 5 strains	400	10	15	21 (2, 7, 21) *	14	(+) >21 days more recovery	Brain-heart infusion (BHI)	[110]
		600							
		900	5			22	>2 day (+)		
5	Cocktail of 5 strains	400–800	3	20	28 (7 days intervals) *	8	≥700 MPa (–)	Meat simulation medium	[108]
6	Cocktail of 5 strains	450	15	18 ± 2	14 (daily) *	4	>72 h (–)	Skim/whole raw milk	[125]
		600	1.5			15	≤14 days (–)		
						30	>72 h (–)		
7	One strain	500	10	25	42 (daily) *	0	(–/+)	Trypticase soy broth (TSB) and phosphate-buffered saline (PBS)	[127]
						5	(+)		
						10			
						15			
8	Cocktail of 7 strains	593	3	4	75 (1, 7, 14, 28, 45, 60, 75) *	4	(–)	Coconut water	[113]
						10			
9	Cocktail of 4 strains	600	3	4	35 (0, 7, 14, 21, 28, 35) *	4	(–)	Cooked pork sausage	[101]
						10	≤21 day (–) 35 day (+)		

*—days of sampling for testing; (–)—no presence/no recovery during the whole storage period; (+)—presence/recovery during the storage period (–/+)—limited recovery during the storage period.

3.2.1. Cell Recovery in the Food Matrix

A study by Tomasula et al., (2014) [99] showed the presence of damage to the surface of *L. monocytogenes* cells in a packaged Queso Fresco (QF) cheese, using scanning microscopy (at 5000× magnification), following HPP treatment under pressures of 400 and 600 MPa, with the changes being more pronounced at a higher-pressure values (visible bud scars and cell shrinkage). Before the HPP treatment, the surfaces of the *L. monocytogenes* cells were smooth, similar to their state after the treatment with a pressure of 200 MPa. Increasing the 200 MPa pressure action time to 20 min resulted in the formation of bud scars on the surface of the cells, which indicated that the membrane was disrupted or lost its integrity. Even though the disruption was visible, it did not cause cell death. The study found that, irrespective of the HPP treatment parameters, most of the *L. monocytogenes* cells (at 4 °C) were damaged, and a decrease was noted in the percentage of damaged cells as the storage time progressed (up to day 14). Compared to a temperature of 10 °C, a small, statistically insignificant change was observed in the difference in the *L. monocytogenes* count (a higher temperature facilitated the growth of the pathogen). In general, the exposure of QF to the HPP treatment (600 MPa, 3 min) resulted in the regeneration of damaged cells and the growth of *L. monocytogenes* within 1.00 log CFU/g after 42 days of storage, to reach a value of 8.24 ± 0.41 log CFU/g after 60 days of storage. A study by Valdramidis et al. (2015) [108] concerning the assessment of pressurisation conditions in the production of meat products with reduced salt content and their effect on the development of *L. monocytogenes* during storage observed that all the pressurisation treatments within a range above 500 MPa significantly reduced the *L. monocytogenes* count (below the detection level immediately after treatment). However, over the subsequent days of storage, the growth

of *L. monocytogenes* in the tested samples was observed. A pressure of approx. 450 MPa had no significant effect on the levels of *L. monocytogenes* immediately after treatment or during storage. Only a combination of pressures of 700 and 800 MPa with different salt concentrations resulted in the preserved product being microbiologically stable even after a 28-day storage period. The regenerability of *L. monocytogenes* cells, similar to that showed in the cited results, was also observed by Jofré et al. (2010) [110]—the researchers demonstrated the possible growth of *L. monocytogenes* cells in broth mediums following the treatment with pressures of 400 and 600 MPa for 10 min; even if immediately following HPP, the number of cells was below the detection level.

3.2.2. Cell Recovery in Growth Mediums

A study by Bozoglu et al., (2004) [13] showed that no *L. monocytogenes* cells could be detected immediately after the treatment with pressures of up to 550 MPa. However, the same study demonstrated the presence of damaged but viable *L. monocytogenes* cells in pressure-treated samples that were able to grow after six days of storage at 4 °C, as well as after one day at 22 °C and 30 °C, on both a selective and non-selective growth medium, which suggests the existence of secondary damage. Nakaura et al., (2019) [127] proved that the regeneration of HPP-damaged *L. monocytogenes* cells on growth mediums (TSB and PBS) was determined by many factors, from the availability of nutrients to the duration and temperature of storage. The researchers demonstrated that most of the cells that were damaged following pressurisation (500 MPa, 25 °C, 10 min) during a 42-day period of storage at 5 °C, 10 °C, and 15 °C regained their ability to proliferate and were able to reach the initial count or even exceed it. This study demonstrated that the regeneration of *L. monocytogenes* cells subjected to the HPP treatment at 0 °C was limited in comparison with 5 °C, 10 °C, or 15 °C, and was more intense at temperatures lower than the optimal bacterial growth temperature. These results are consistent with the results presented in other publications [125,126]. A study by Bull et al., (2005) [125] proved the ability of *L. monocytogenes* cells to regenerate during storage after treatment with pressures of 450 and 600 MPa, and differences in the regeneration of pathogen cells, resulting from the type of medium used, temperature, and storage duration. The study demonstrated that damaged *L. monocytogenes* cells could regenerate in specially enriched mediums after milk samples were stored at 4 °C, 15 °C, and 30 °C (maximum regeneration after 24–72 h of storage), with the regeneration efficiency decreasing to 0% after the longer storage of milk at 4 °C and 30 °C. The study also noted that storage at 15 °C affected the highest regeneration rate (regeneration efficiency at a level of 100%), which remained high for 14 days of storage. On the other hand, a study by Koseki and Yamamoto (2007) [126] investigated the effect of various combinations of pressure (200–400 MPa), durations of treatment (1–30 min), and growth mediums on the regenerability of cells following storage at different temperatures (20 °C and 37 °C) and storage times (10, 20, and 30 days). It was found that the pathogen cells were able to regenerate, even if no viable cells were detected immediately after HPP, following storage for 10–30 days at 20 °C (no regeneration of cells was detected during storage at 37 °C).

The cited studies clearly indicate that HPP (in various combinations of pressure, duration of treatment, and temperature) can induce not so much the death of *L. monocytogenes* cells, but rather their damage and transformation to a VBNC state. Due to the regenerability of *L. monocytogenes* cells during storage (even under refrigerated conditions and a storage period of $\geq$42 days from the time of HPP treatment), they exhibit regenerability and the possibility to return to viability, which may consequently translate into a return of the population to a level comparable with its initial count [99,127]. These properties are clearly determined by many variables (e.g., parameters, the type of matrix used, storage temperature, and duration), which should be taken into account when carrying out subsequent studies [108,113,127].

3.3. Effect of HPP on Antibiotic Resistance and Antibiotic Resistance Gene Expression

The environmental stress induced by the effects of food preservation methods undoubtedly has a significant impact on changes in the antibiotic resistance of microbial strains. The scientific literature provides little information on the effect of pascalisation on antibiotic resistance and the expression of genes encoding this resistance in *L. monocytogenes* strains. Only a few reviews have focused on investigating the impact related to strain tolerance to pascalisation and antibiotic resistance [10,100].

The first study concerning an assessment of the survivability of antibiotic-resistant *L. monocytogenes* strains following HPP treatment was described by Bruschi et al. (2017) [100]. The study used strains resistant to one or two antibiotics simultaneously (tetracyclines, ciprofloxacin, erythromycin, nitrofurantoin). The researchers showed that antibiotic-resistant *L. monocytogenes* strains exhibited higher survivability rates following the application of HPP at a pressure value of 400 MPa.

Duru et al., (2020) [10] in their study examined the relationship between the presence of antibiotic resistance genes and tolerance to HPP-induced stress. The obtained data on gene occurrence did not indicate the existence of antibiotic resistance-encoding genes specific to the strains under analysis. The same genes encoding antibiotic resistance were detected in all *L. monocytogenes* strains that were analysed (n = 10) (*FosX*, *mprF*, *norB*, *lin*). For the first three genes, differences in amino acid sequences between strains were demonstrated. However, it is not known whether these differences contribute to an increase in antibiotic resistance. The researchers also demonstrated that the amino acid sequence of the gene encoding resistance to quinolones (*norB*) and of the gene encoding resistance to lincomycin (*lin*) differed slightly between strains. Interestingly, the differences in gene expression were related to the time following the action of pressure and to the strain type. They thus confirmed the observation that differences in antibiotic resistance genes may ensure different levels of barotolerance within the *L. monocytogenes* strains. The researchers believe that it is actually possible to use antibiotic resistance more effectively in protection against pressurisation-induced stress.

3.4. Effect of HPP on Virulence Factors and Expression of Virulence Genes

L. monocytogenes possess a number of defence mechanisms against the adverse environmental conditions prevailing during food processing that enable adaptation and/or survival [128]. One of the mechanisms is the ability of cells to exchange information (i.e., communicate with each other). One of the most important microbial communication systems that transforms individual behaviours into group ones is the *quorum sensing* (QS) system that uses signalling molecules, so-called autoinducers. Autoinducer-2 (AI-2) is a signalling molecule produced by the LuxS enzyme that allows bacteria to organise into a biofilm that provides an ideal environment for pathogen growth and development, which is a key concern for the food industry. This enzyme is also a key enzyme in the activated methyl cycle, a crucial central metabolic pathway [129,130].

The impact of sub-lethal stresses leads to the adaptation of *L. monocytogenes* to unfavourable environmental conditions, which consequently translates into changes in the expression profiles of specific sets of genes [131]. The potential of *L. monocytogenes* to respond to adverse conditions or changes in the environment is determined by various alternative sigma SigB (σ^B) factors and the genes it controls, which contribute to an increase in this pathogen's survival of processes such as HPP [132]. This factor is responsible for inducing the transcription factor PrfA (the main virulence regulator of *L. monocytogenes*) and, therefore, plays a very important role in the virulence of this pathogen [128,133,134]. The alternative sigma factor (SigB (σ^B)) allows *L. monocytogenes* to proliferate and survive under stressful conditions in non-host environments [135], including those found in foods, such as acidic or osmotic conditions [132,136].

HPP-induced environmental stress can directly contribute to the activation of virulence mechanisms and the expression of specific sets of genes involved in virulence. Currently, there are few scientific reports on the effect of environmental stress on the expression

and regulation of virulence genes in *L. monocytogenes* that survive HPP treatment in food matrices [112,128] and growth mediums [14,15,137] (Table 5).

Table 5. Effects of HPP on the expression of genes encoding *L. monocytogenes* virulence.

No.	Strains	HPP			Virulence Genes	Expression	Food/Medium	Reference
		Pressure (MPa)	Time (min)	Temp. (°C)				
1	2 strains	450	10	19	*plcA*, *hly*, *iap*, *sigB*	General strain-dependent overexpression/suppression (mainly *hly sigB*, *plcA*)	Dry-cured ham	[112]
		600	5					
2	2 strains	450	10	16	*prfA*, *plcA*, *hly*, *sigB*, *lmo1421*			[128]
		600	5					
3	1 strain	200	3	12	*luxS*	Upregulation	Trypticase soy broth (TSB)	[15]
		400						
4	2 strains	200	8	8	*sigB*, *hpf*, *prfA*	Upregulation	TSBYE	[14]
		400						
5	2 strains	400	5	15	*sigB*, *prfA*	Strong suppression	TSBYE	[137]
		600						

TSBYE—Tryptic soy broth with 0.6% *w*/*v* yeast extract.

Previous research has focused on the assessment of the expression of the following genes involved in virulence: *plcA*, *hly*, *iap*, *sigB*, *prfA*, *luxS*, *hpf*. A study by Pérez-Baltar et al., (2020) [112] assessed the expression of three virulence genes (*plcA*, *hly*, *iap*) and one stress-related gene (*sigB*) in a dried ham with different water activities (a_w) (0.92, 0.88, 0.84) under the influence of pressurisation (450 MPa/10 min and 600 MPa/5 min) over 30 days of storage at 4 °C in two *L. monocytogenes* strains representing different serotypes, namely serotype 1/2b (S4-2) and serotype 1/2c (S12-1). The researchers concluded that the HPP-surviving bacteria gene transcription patterns were strain-dependent. In the strain belonging to serotype 1/2b, the *plcA*, *hly*, *iap* and *sigB* genes were overexpressed, while in the strain belonging to serotype 1/2c, the analysed genes were suppressed. The induction of both overexpression and suppression of the analysed genes was lower for samples with the lowest a_w. Such differences had already been previously observed [138,139]. According to the authors, the greater damage caused by the greater susceptibility of the strain belonging to serotype 1/2c to HPP resulted in increased expression of the genes responsible for cell regeneration without the activation of the genes associated with virulence and stress response. Another study, carried out by Pérez-Baltar et al., (2021) [128], evaluated the effect of HPP on the expression of five genes involved in virulence and stress response of two *L. monocytogenes* species representing different serotypes, i.e., S2 (serotype 1/2a) and S7-2 (serotype 4b). The researchers noted suppression of the expression of genes *sigB* and *prfA* immediately following the application of pressure of either 450 or 600 MPa for the first of the analysed strains. For the second strain, the relative expression of both analysed genes was significantly upregulated ($p < 0.05$), being more pronounced at 450 MPa. When stored at 4 °C, gene overexpression was suppressed (a significant reduction from day 7 onwards). As for the *plcA* and *hly* genes, immediately after treatments, a slightly repressed expression was noted for the first analysed strain and overexpression for the second one. As regards the *plcA* gene, the transcription level was lower than that for *hly*.

Some studies focused on the analysis of genes involved in virulence in the growth medium. Bowman et al., (2008) [137] reported suppression of the expression of the genes associated with cell growth and virulence when *L. monocytogenes* strains were subjected to high pressures in TSYE broth. Treatment with a pressure of 400 or 600 MPa for 5 min resulted in a decrease in *sigB* and *prfA* gene expression for the *L. monocytogenes* strain belonging to serotype 1/2a, with the pressure of 400 MPa causing a greater decrease in

expression. This study also observed an increase in the expression of genes associated with motility and chemotaxis, which can be linked to both the ongoing repair processes and changes in the energy capacity of the cell. A study by Chen et al., (2021) [15] showed a significant increase in the expression of *LuxS* following the HPP treatment, which may consequently lead to the promotion of the activated methyl cycle, quorum sensing, and biofilm formation. In addition, the researchers noted differences in the expression of genes involved in numerous other processes, including cell cycle control, cell division, and chromosome partitioning; cell wall, membrane, and envelope biogenesis; energy production and conversion; lipid transport and metabolism; nucleotide transport and metabolism; post-translational modification, protein turnover and chaperone; replication, recombination and repair; transcription as well as translation, ribosomal structure and biogenesis. A study by Duru et al., (2021) [14] analysed the expression of genes during the regeneration of *L. monocytogenes* at different time intervals following HPP treatment at two different pressure values (200 MPa and 400 MPa). The experiments were conducted using two strains, i.e., RO15 (line II, serotype 1/2a), a strain more resistant to HPP than the other ones, and ScottA (line I, serotype 4b), a strain more susceptible to HPP. The researchers showed that the stress response was activated by the general stress factor B (σ^B). The mainly affected the expression of genes responsible for protein folding, PTS system genes (phosphotransferase system; mostly fructose-, mannose-, galactitol-, cellobiose-, and ascorbate-specific PTS systems) and cobalamin biosynthesis genes. The genes mentioned earlier were the most upregulated genes during HPP damage recovery. The researchers observed that cell-division-related genes (*divIC*, *dicIVA*, *ftsE*, and *ftsX*) were downregulated. By contrast, peptidoglycan-synthesis genes (*murG*, *murC*, and *pbp2A*) were upregulated, indicating regeneration of cell damage after HPP through cell wall repair. The researchers also observed that the non-encoding RNA *Rli47* plays a role in the regeneration of post-HPP damage in *L. monocytogenes*, and that the *pbp2A* mutants were more susceptible to HPP.

4. Conclusions

The cited study results indicate relationships between different combinations of pressure, duration of treatment, temperature, type of matrix used, individual strain characteristics, developmental stage or storage parameters, and survivability, antibiotic resistance, virulence, and gene expression in *L. monocytogenes* strains under the influence of HPP-induced environmental stress. The literature review presents the current knowledge on the effects of HPP on survivability, regenerability of the cells after storage, virulence, and antibiotic resistance of *L. monocytogenes*. It also points to the lack of sufficient knowledge on the assessment of antibiotic resistance, virulence and the expression of antibiotic resistance genes and virulence in the *L. monocytogenes* cells that survived. The available reports are only an indication towards future research directions. More strains need to be evaluated to explain which individual strain characteristics are associated with the HPP-induced cellular response. It is also necessary to assess the changes in antibiotic resistance and virulence of *L. monocytogenes* strains.

Author Contributions: Conceptualization, P.W., W.C.-W. and A.Z.; Literature data collection, P.W., W.C.-W. and A.Z.; writing—original draft preparation, P.W.; writing—review and editing, W.C.-W. and A.Z.; supervision, W.C.-W. and A.Z.; funding acquisition, A.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded in whole by the National Science Centre (Poland) project number 2018/29/B/NZ9/00645 (OPUS-15).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

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

References

1. Nabi, B.G.; Mukhtar, K.; Arshad, R.N.; Radicetti, E.; Tedeschi, P.; Shahbaz, M.U.; Walayat, N.; Nawaz, A.; Inam-Ur-Raheem, M.; Aadil, R.M. High-Pressure Processing for Sustainable Food Supply. *Sustainability* **2021**, *13*, 13908. [CrossRef]
2. Huang, H.W.; Wu, S.Z.; 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]
3. Grossi, A.; Bolumar, T.; Soltoft-Jensen, J.; Orlien, V. High pressure treatment of brine enhanced pork semitendinosus: Effect on microbial stability, drip loss, lipid and protein oxidation, and sensory properties. *Innov. Food Sci. Emerg.* **2014**, *22*, 11–21. [CrossRef]
4. Komora, N.; Maciel, C.; Amaral, R.A.; Fernandes, R.; Castro, S.M.; Saraiva, J.A.; Teixeira, P. Innovative hurdle system towards *Listeria monocytogenes* inactivation in a fermented meat sausage model—High pressure processing assisted by bacteriophage P100 and bacteriocinogenic *Pediococcus acidilactici*. *Food Res. Int.* **2021**, *148*, 110628. [CrossRef] [PubMed]
5. Zhu, J.; Li, S.; Yan, T.; Sun, X.; Ma, L.; Meng, X.; Lu, X. Whole transcriptome sequencing analysis of the effect of high hydrostatic pressure on *Escherichia coli* O157:H7. *J. Agric. Food Res.* **2021**, *4*, 100147. [CrossRef]
6. Huang, H.W.; Hsu, C.P.; Wang, C.Y. Healthy expectations of high hydrostatic pressure treatment in food processing industry. *JFDA* **2020**, *28*, 1–13. [CrossRef] [PubMed]
7. Mukhtar, K.; Nabi, B.G.; Arshad, R.N.; Roobab, U.; Yaseen, B.; Ranjha, M.M.A.N.; Aadil, R.M.; Ibrahim, S.A. Potential impact of ultrasound, pulsed electric field, high-pressure processing and microfludization against thermal treatments preservation regarding sugarcane juice (*Saccharum officinarum*). *Ultrason Sonochem.* **2022**, *90*, 106194. [CrossRef]
8. Roobab, U.; Inam-Ur-Raheem, M.; Khan, A.W.; Arshad, R.N.; Zeng, X.; Aadil, R.M. Innovations in High-Pressure Technologies for the Development of Clean Label Dairy Products: A Review. *Food Rev. Int.* **2023**, *39*, 970–991. [CrossRef]
9. Ferreira, M.; Almeida, A.; Delgadillo, I.; Saraiva, J.; Cunha, Â. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* to high pressure processing: A review. *Food Rev. Int.* **2016**, *32*, 377–399. [CrossRef]
10. Duru, I.C.; Andreevskaya, M.; Laine, P.; Rode, T.M.; Ylinen, A.; Løvdal, T.; Bar, N.; Crauwels, P.; Riedel, C.U.; Bucur, F.I.; et al. Genomic characterization of the most barotolerant *Listeria monocytogenes* RO15 strain compared to reference strains used to evaluate food high pressure processing. *BMC Genom.* **2020**, *21*, 455. [CrossRef]
11. Wiśniewski, P.; Zakrzewski, A.J.; Zadernowska, A.; Chajęcka-Wierzchowska, W. Antimicrobial resistance and virulence characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environments. *Pathogens* **2022**, *11*, 1099. [CrossRef] [PubMed]
12. Wiktorczyk-Kapischke, N.; Skowron, K.; Grudlewska-Buda, K.; Wałecka-Zacharska, E.; Korkus, J.; Gospodarek-Komkowska, E. Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to the stress factors in the food processing environment. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 710085. [CrossRef] [PubMed]
13. Bozoglu, F.; Alpas, H.; Kaletunç, G. Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage. *FEMS Microbiol. Immunol.* **2004**, *40*, 243–247. [CrossRef] [PubMed]
14. Duru, I.C.; Bucur, F.I.; Andreevskaya, M.; Nikparvar, B.; Ylinen, A.; Grigore-Gurgu, L.; Rode, T.M.; Crauwels, P.; Laine, P.; Paulin, L.; et al. High-pressure processing-induced transcriptome response during recovery of *Listeria monocytogenes*. *BMC Genom.* **2021**, *22*, 117. [CrossRef] [PubMed]
15. Chen, G.-W.; Chen, Y.-A.; Chang, H.-Y.; Huang, T.-C.; Chen, T.-Y. Combined impact of high-pressure processing and slightly acidic electrolysed water on *Listeria monocytogenes* proteomes. *Food Res. Int.* **2021**, *147*, 110494. [CrossRef] [PubMed]
16. Simonin, H.; Duranton, F.; de Lamballerie, M. New insights into the highpressure processing of meat and meat products. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2012**, *11*, 285–306. [CrossRef]
17. Possas, A.; Perez-Rodriguez, F.; Valero, A.; Garcia-Gimeno, R.M. Modelling the inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure processing in foods: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, *70*, 45–55. [CrossRef]
18. Meloni, D. High-hydrostatic-pressure (HHP) processing technology as a novel control method for *Listeria monocytogenes* occurrence in Mediterranean-style dryfermented sausages. *Foods* **2019**, *8*, 672. [CrossRef]
19. Chawla, R.; Patil, G.R.; Singh, A.K. High hydrostatic pressure technology in dairy processing: A review. *J. Food Sci. Technol.* **2011**, *48*, 260–268. [CrossRef]
20. Li, Y.; Huang, T.Y.; Mao, Y.; Chen, Y.; Shi, F.; Peng, C.; Chen, J.; Yuan, L.; Bai, C.; Chen, L.; et al. Study on the viable but non-culturable (VBNC) state formation of *Staphylococcus aureus* and its control in food system. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 599739. [CrossRef]
21. Wideman, N.E.; Oliver, J.D.; Crandall, P.G.; Jarvis, A.N. Detection and potential virulence of viable but non-culturable (VBNC) *Listeria monocytogenes*: A review. *Microorganisms* **2021**, *9*, 194. [CrossRef] [PubMed]
22. Cavalcanti, A.A.C.; Limeira, C.H.; de Siqueira, I.N.; de Lima, A.C.; de Medeiros, F.J.C.; de Souza, J.G.; Medeiros, N.G.D.A.; Oliveira Filho, A.A.D.; Melo, M.A.D. The prevalence of *Listeria monocytogenes* in meat products in Brazil: A systematic literature review and meta-analysis. *Res. Vet. Sci.* **2022**, *145*, 169–176. [CrossRef] [PubMed]
23. Tahir, R.; Rabbani, M.; Ahmad, A.; Tipu, M.Y.; Chaudhary, M.H.; Jayarao, B.M. Study on occurrence of *Listeria monocytogenes* in soil of Punjab Province and its associated risk factors. *J. Anim. Plant Sci.* **2022**, *32*, 45–51. [CrossRef]
24. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Listeria Outbreaks. Available online: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html (accessed on 29 August 2023).

25. Orsi, R.H.; den Bakker, H.C.; Wiedmann, M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int. J. Mol. Med.* **2011**, *301*, 79–96. [CrossRef] [PubMed]
26. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on Microbiological Criteria for Foodstuffs. Available online: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/txt/pdf/?uri=celex:02005r2073-20200308&from=en (accessed on 11 September 2021).
27. Bhunia, A.K. Listeria monocytogenes. In *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*; Bhunia, A.K., Ed.; Food Science Text Series; Springer: New York, NY, USA, 2018; pp. 229–248. [CrossRef]
28. Lopes-Luz, L.; Mendonça, M.; Bernardes Fogaça, M.; Kipnis, A.; Bhunia, A.K.; Bührer-Sékula, S. *Listeria monocytogenes*: Review of pathogenesis and virulence determinants-targeted immunological assays. *Crit. Rev. Microbiol.* **2021**, *47*, 647–666. [CrossRef]
29. Chen, Y.; Chen, Y.; Pouillot, R.; Dennis, S.; Xian, Z.; Luchansky, J.B. Genetic diversity and profiles of genes associated with virulence and stress resistance among isolates from the 2010–2013 interagency *Listeria monocytogenes* market basket survey. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0231393. [CrossRef]
30. Cotter, P.D.; Draper, L.A.; Lawton, E.M.; Daly, K.M.; Groeger, D.S.; Casey, P.G.; Ross, R.P.; Hill, C. Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of Lineage I *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog.* **2008**, *4*, e1000144. [CrossRef]
31. Maury, M.M.; Tsai, Y.H.; Charlier, C.; Touchon, M.; Chenal-Francisque, V.; Leclercq, A.; Criscuolo, A.; Gautier, C.; Roussel, S.; Brisabois, A. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat. Genet.* **2016**, *48*, 308–313. [CrossRef]
32. Chen, M.; Cheng, J.; Zhang, J.; Chen, Y.; Zeng, H.; Xue, L.; Lei, T.; Pang, R.; Wu, S.; Wu, H.; et al. Isolation, Potential Virulence, and Population Diversity of *Listeria monocytogenes* From Meat and Meat Products in China. *Front. Microbiol.* **2019**, *7*, 946. [CrossRef]
33. De Melo Tavares, R.; da Silva, D.A.L.; Camargo, A.C.; Yamatogi, R.S.; Nero, L.A. Interference of the acid stress on the expression of llsX by *Listeria monocytogenes* pathogenic island 3 (LIPI-3) variants. *Food Res. Int.* **2020**, *132*, 109063. [CrossRef]
34. Disson, O.; Moura, A.; Lecuit, M. Making sense of the biodiversity and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol.* **2021**, *29*, 811–822. [CrossRef] [PubMed]
35. Zhao, X.; Zhong, J.; Wei, C.; Lin, C.-W.; Ding, T. Current perspectives on viable but nonculturable state in foodborne pathogens. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 580. [CrossRef] [PubMed]
36. Kumar, S.S.; Ghosh, R.A. Assessment of bacterial viability: A comprehensive review on recent advances and challenges. *Microbiology* **2019**, *165*, 593–610. [CrossRef] [PubMed]
37. Besnard, V.; Federighi, M.; Declerg, E.; Jugiau, F.; Cappelier, J.M. Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Vet. Res.* **2002**, *33*, 359–370. [CrossRef] [PubMed]
38. Cunningham, E.; O'Byrne, C.; Oliver, J.D. Effect of weak acids on *Listeria monocytogenes* survival: Evidence for a viable but nonculturable state in response to low pH. *Food Control* **2009**, *20*, 1141–1144. [CrossRef]
39. Highmore, C.J.; Warner, J.C.; Rothwell, S.D.; Wilks, S.A.; Keevil, C.W. Viable-but-nonculturable *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica Serovar* Thompson induced by chlorine stress remain infection. *mBio* **2018**, *9*, e00540-18. [CrossRef] [PubMed]
40. Trinh, N.T.T.; Dumas, E.; Le Thanh, M.; Degraeve, P.; Amara, C.B.; Gharsallaoui, A.; Oulahal, N. Effect of a Vietnamese Cinnamomum cassia essential oil and its major component transcinnamaldehyde on the cell viability, membrane integrity, membrane fluidity, and proton motive force of *Listeria innocua*. *Can. J. Microbiol.* **2015**, *61*, 263–271. [CrossRef]
41. Walczycka, M. Metody inaktywacji i hamowania wzrostu *Listeria monocytogenes* w przetworach mięsnych. *Ż. Nauk. Technol. J.* **2005**, *2*, 61–72.
42. Scallan, E.; Hoekstra, R.M.; Angulo, F.J.; Tauxe, R.V.; Widdowson, M.A.; Roy, S.L.; Griffin, P.M. Foodborne illness acquired in the United States—Major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 7–15. [CrossRef]
43. Dortet, L.; Veiga-Chacon, E.; Cossart, P. Listeria monocytogenes. In *Encyclopedia of Microbiology*; Schaechter, M., Ed.; Institute Pasteur: Paris, France, 2009; pp. 182–198.
44. Olaimat, A.N.; Al-Holy, M.; Shahbaz, H.M.; Al-Nabulsi, A.A.; Abu Ghoush, M.H.; Osaili, T.M.; Ayyash, M.M.; Holley, R.A. Emergence of Antibiotic Resistance in *Listeria monocytogenes* Isolated from Food Products: A Comprehensive Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2018**, *17*, 1277–1292. [CrossRef]
45. Noll, M.; Kleta, S.; Al Dahouk, S. Antibiotic susceptibility of 259 *Listeria monocytogenes* strains isolated from food, food-processing plants, and human samples in Germany. *J. Infect. Public Health* **2018**, *11*, 572–577. [CrossRef] [PubMed]
46. Srinivasan, V.; Nam, H.M.; Nguyen, L.T.; Tamilselvam, B.; Murinda, S.E.; Oliver, S.P. Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms. *Foodborne Pathog. Dis.* **2005**, *2*, 201–211. [CrossRef] [PubMed]
47. Li, L.; Olsen, R.H.; Ye, L.; Wang, W.; Shi, L.; Yan, H.; Meng, H. Characterization of antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from a pork processing plant and its respective meat markets in southern China. *Foodborne Pathog. Dis.* **2016**, *13*, 262–268. [CrossRef] [PubMed]
48. Granier, S.A.; Moubareck, C.; Colaneri, C.; Lemire, A.; Roussel, S.; Dao, T.T.; Brisabois, A. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 2788–2790. [CrossRef] [PubMed]
49. Lim, S.Y.; Yap, K.P.; Thong, K.L. Comparative genomics analyses revealed two virulent *Listeria monocytogenes* strains isolated from ready-to-eat food. *Gut Pathog.* **2016**, *8*, 65. [CrossRef]
50. Wilson, A.; Gray, J.; Chandry, P.S.; Fox, E.M. Phenotypic and genotypic analysis of antimicrobial resistance among *Listeria monocytogenes* isolated from Australian food production chains. *Genes* **2018**, *9*, 80. [CrossRef]

51. Iwu, C.D.; Okoh, A.I. Characterization of antibiogram fingerprints in *Listeria monocytogenes* recovered from irrigation water and agricultural soil samples. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0228956. [CrossRef]
52. Rakic-Martinez, M.; Drevets, D.A.; Dutta, V.; Katic, V.; Kathariou, S. *Listeria monocytogenes* strains selected on ciprofloxacin, or the disinfectant benzalkonium chloride exhibit reduced susceptibility to ciprofloxacin, gentamicin, benzalkonium chloride, and other toxic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 8714–8721. [CrossRef]
53. Kovacevic, J.; Sagert, J.; Wozniak, A.; Gilmour, M.W.; Allen, K.J. Antimicrobial resistance and co-selection phenomenon in *Listeria* spp. recovered from food and food production environments. *Food Microbiol.* **2013**, *34*, 319–327. [CrossRef]
54. Godreuil, S.; Galimand, M.; Gerbaud, G.; Jacquet, C.; Courvalin, P. Efflux pump *Lde* is associated with fluoroquinolone resistance in *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 704–708. [CrossRef]
55. Chen, M.; Cheng, J.; Wu, Q.; Zhang, J.; Chen, Y.; Xue, L.; Lei, T.; Zeng, H.; Wu, S.; Ye, Q.; et al. Occurrence, antibiotic resistance, and population diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh aquatic products in China. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2215. [CrossRef] [PubMed]
56. Maung, A.T.; Mohammadi, T.N.; Nakashima, S.; Liu, P.; Masuda, Y.; Honjoh, K.I.; Miyamoto, T. Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken meat in Fukuoka, Japan. *Int. J. Food Microbiol.* **2019**, *2*, 49–57. [CrossRef] [PubMed]
57. Hailu, W.; Helmy, Y.A.; Carney-Knisely, G.; Kauffman, M.; Fraga, D.; Rajashekara, G. Prevalence and antimicrobial resistance profiles of foodborne pathogens isolated from dairy cattle and poultry manure amended farms in Northeastern Ohio, the United States. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1450. [CrossRef] [PubMed]
58. Kayode, A.J.; Semerjian, L.; Osaili, T.; Olapade, O.; Okoh, A.I. Occurrence of multidrug-resistant *Listeria monocytogenes* in environmental waters: A menace of environmental and public health concern. *Front. Environ. Sci.* **2021**, *9*, 737435. [CrossRef]
59. Mpondo, L.; Ebomah, K.E.; Okoh, A.I. Multidrug-resistant *Listeria* species shows abundance in environmental waters of a key district municipality in South Africa. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 481. [CrossRef]
60. Park, E.; Ha, J.; Oh, H.; Kim, S.; Choi, Y.; Lee, Y.; Kim, Y.; Seo, Y.; Kang, J.; Yoon, Y. High prevalence of *Listeria monocytogenes* in smoked duck: Antibiotic and heat resistance, virulence, and genetics of the isolates. *Food Sci. Anim. Resour.* **2021**, *41*, 324–334.
61. Swetha, C.S.; Porteen, K.; Elango, A.; Ronald, B.S.M.; Senthil Kumar, T.M.A.; Milton, A.P.; Sureshkannan, S. Genetic diversity, virulence and distribution of antimicrobial resistance among *Listeria monocytogenes* isolated from milk, beef, and bovine farm environment. *Iran. J. Vet. Res.* **2021**, *22*, 1–8. [CrossRef]
62. Tîrziu, E.; Herman, V.; Nichita, I.; Morar, A.; Imre, M.; Ban-Cucerzan, A.; Bucur, I.; Tîrziu, A.; Mateiu-Petrec, O.C.; Imre, K. Diversity and antibiotic resistance profiles of *Listeria monocytogenes* serogroups in different food products from the transylvania region of central Romania. *J. Food Prot.* **2022**, *85*, 54–59. [CrossRef]
63. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA J.* **2022**, *20*, e07666. [CrossRef]
64. Magalhaes, R.; Almeida, G.; Ferreira, V.; Santos, I.; Silva, J.; Mendes, M.M.; Pita, J.; Mariano, G.; Mancio, I.; Sousa, M.M.; et al. Cheese-related listeriosis outbreak, Portugal, March 2009 to February 2012. *Eurosurveillance* **2012**, *20*, 21104. [CrossRef]
65. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Multicountry Outbreak of *Listeria monocytogenes* Infections Linked to Consumption of Salmon Products. Available online: https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/multi-country-outbreak-listeria-monocytogenes-infections-linked-consumption-salmon (accessed on 29 August 2023).
66. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Epidemiological Update: Multi-Country Outbreak of *Listeria monocytogenes* Serogroup IVb, Multi-Locus Sequence Type 6 Infections. Available online: https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-multi-country-outbreak-listeria-monocytogenes-serogroup-ivb (accessed on 29 August 2023).
67. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Multicountry Outbreak of *Listeria monocytogenes* Clonal Complex 8 Infections Linked to Consumption of Cold-Smoked Fish Products. Available online: https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/multi-country-outbreak-listeria-monocytogenes-fish-products (accessed on 29 August 2023).
68. World Health Organization (WHO). Listeriosis–Spain. Available online: https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2019-DON256 (accessed on 29 August 2023).
69. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Commercially Produced, Prepackaged Caramel Apples Made from Bidart Bros. Apples (Final Update). Available online: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/caramel-apples-12-14/index.html (accessed on 29 August 2023).
70. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Fresh Produce–Associated Listeriosis Outbreaks, Sources of Concern, Teachable Moments, and Insights. Sprouts and Investigation of Human Listeriosis Cases (Final Update). Available online: http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bean-sprouts-11-14/index.html (accessed on 29 August 2023).
71. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Blue Bell Creameries Products (Final Update). Available online: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/ice-cream-03-15/index.html (accessed on 30 August 2023).
72. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Packaged Salads Produced at Springfield, Ohio Dole Processing Facility (Final Update). Available online: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bagged-salads-01-16/index.html (accessed on 29 August 2023).
73. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Raw Milk Produced by Miller's Organic Farm in Pennsylvania (Final Updonlinee). Available online: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/raw-milk-03-16/index.html (accessed on 29 August 2023).

74. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Frozen Vegetables (Final Update). Available online: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/frozen-vegetables-05-16/index.html (accessed on 29 August 2023).
75. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Soft Cheeses Distributed by Karoun Dairies, Inc. (Final Update). Available online: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/soft-cheeses-09-15/index.html (accessed on 29 August 2023).
76. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Soft Raw Milk Cheese Made by Vulto Creamery (Final Update). Available online: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/soft-cheese-03-17/index.html (accessed on 29 August 2023).
77. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of *Listeria* Infections Linked to Hard-Boiled Eggs. Available online: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/eggs-12-19/index.html (accessed on 29 August 2023).
78. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of *Listeria* Infections Linked to Enoki Mushrooms. Available online: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/enoki-mushrooms-03-20/index.html (accessed on 12 September 2023).
79. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of *Listeria* Infections Linked to Deli Meats. Available online: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/delimeat-10-20/index.html (accessed on 29 August 2023).
80. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). *Listeria* Outbreak Linked to Fully Cooked Chicken. Available online: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/precooked-chicken-07-21/index.html (accessed on 29 August 2023).
81. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). *Listeria* Outbreak Linked to Ice Cream. Available online: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/monocytogenes-06-22/index.html (accessed on 29 August 2023).
82. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Listeria Outbreak Linked to Packaged Salads Produced by Fresh Express. Available online: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/packaged-salad-12-21-b/index.html (accessed on 29 August 2023).
83. Chen, Y.; Burall, L.S.; Luo, Y.; Timme, R.; Melka, D.; Muruvanda, T.; Payne, J.; Wang, C.; Kastanis, G.; Maounounen-Laasri, A.; et al. *Listeria monocytogenes* in stone fruits linked to a multistate outbreak: Enumeration of cells and whole-genome sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 7030–7040. [CrossRef] [PubMed]
84. Self, J.L.; Conrad, A.; Stroika, S.; Jackson, A.; Whitlock, L.; Jackson, K.A.; Beal, J.; Wellman, A.; Fatica, M.K.; Bidol, S.; et al. Multistate outbreak of listeriosis associated with packaged leafy green salads, United States and Canada, 2015–2016. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *8*, 1461–1468. [CrossRef] [PubMed]
85. World Health Organization (WHO). Listeriosis—South Africa. Available online: https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/28-march-2018-listeriosis-south-africa-en (accessed on 29 August 2023).
86. Das, A.; Sai Mala, G.; Singh, R.S.; Majumdar, A.; Chatterjee, R.; Chaudhuri, I.; Mahapatra, T. Prelacteal feeding practice and maintenance of exclusive breast feeding in Bihar, India—Identifying key demographic sections for childhood nutrition interventions: A cross-sectional study. *Glob. Biosecurity* **2019**, *1*, 1. [CrossRef]
87. Kaptchouang Tchatchouang, C.D.; Fri, J.; De Santi, M.; Brandi, G.; Schiavano, G.F.; Amagliani, G.; Ateba, C.N. Listeriosis outbreak in South Africa: A comparative analysis with previously reported cases worldwide. *Microorganisms* **2020**, *8*, 135. [CrossRef] [PubMed]
88. Wu, D.; Forghani, F.; Daliri, B.M.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]
89. Silva, F.V.M. Pasteurization of Food and Beverages by High Pressure Processing (HPP) at Room Temperature: Inactivation of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, and Other Microbial Pathogens. *Appl. Sci.* **2023**, *13*, 1193. [CrossRef]
90. Aganovic, K.; Hertel, C.; Vogel, R.F.; Johne, R.; Schluter, O.; Schwarzenbolz, U.; Jager, H.; Holzhauser, T.; Bergmair, J.; Roth, A.; et al. Aspects of high hydrostatic pressure food processing: Perspectives on technology and food safety. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2021**, *20*, 3225–3266. [CrossRef]
91. EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards); Koutsoumanis, K.; Alvarez-Ordo'nez, A.; Bolton, D.; Bover-Cid, S.; Chemaly, M.; Davies, R.; De Cesare, A.; Herman, L.; Hilbert, F.; et al. Scientific Opinion on the efficacy and safety of high-pressure processing of food. *EFSA J.* **2022**, *20*, 7128–7195. [CrossRef]
92. Buchanan, R.L.; Gorris, L.G.M.; Hayman, M.M.; Jackson, T.C.; Whiting, R.C. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control* **2017**, *75*, 1–13. [CrossRef]
93. Muntean, M.V.; Marian, O.; Barbieru, V.; Cătunescu, G.M.; Ranta, O.; Drocas, I.; Terhes, S. High pressure processing in food industry—Characteristics and applications. *Agric. Agric. Sci. Procedia* **2016**, *10*, 377–383. [CrossRef]
94. Woldemariam, H.W.; Emire, S.A. High pressure processing of foods for microbial and Mycotoxins control: Currenttrends and future prospects. *Cogent Food Agric.* **2019**, *5*, 1622184. [CrossRef]
95. Ritz, M.; Tholozan, J.L.; Federighi, M.; Pilet, M.F. Morphological and physiological characterization of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 2240–2247. [CrossRef] [PubMed]
96. Alpas, H.; Bozoglu, F. Efficiency of high pressure treatment for destruction of *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *FEMS Microbiol. Immunol.* **2023**, *35*, 269e273. [CrossRef]
97. Lopez-Pedemonte, T.; Roig-Sagues, A.; De Lamo, S.; Hernandez-Herrero, M.; Guamis, B. Reduction of counts of *Listeria monocytogenes* in cheese by means of high hydrostatic pressure. *Food Microbiol.* **2007**, *24*, 59–66. [CrossRef] [PubMed]
98. Patterson, M.F.; Mackle, A.; Linton, M. Effect of high pressure, in combination with antilisterial agents, on the growth of *Listeria monocytogenes* during extended storage of cooked chicken. *Food Microbiol.* **2011**, *28*, 1505e1508. [CrossRef] [PubMed]

99. Tomasula, P.M.; Renye, J.A.; Van Hekken, D.L.; Tunick, M.H.; Kwoczak, R.; Toht, M.; Leggett, L.N.; Luchansky, J.B.; Porto-Fett, A.C.; Phillips, J.G. Effect of high-pressure processing on reduction of *Listeria monocytogenes* in packaged queso fresco. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 1281–1295. [CrossRef] [PubMed]
100. Bruschi, C.; Komora, N.; Castro, S.M.; Saraiva, J.; Ferreira, V.B.; Teixeira, P. High hydrostatic pressure effects on *Listeria monocytogenes* and *L. innocua*: Evidence for variability in inactivation behaviour and in resistance to pediocin bacHA-6111-2. *Food Microbiol.* **2017**, *64*, 226–231. [CrossRef]
101. Balamurugan, S.; Inmanee, P.; Souza, J.; Strange, P.; Pirak, T.; Barbut, S. Effects of high pressure processing and hot water pasteurization of cooked sausages on inactivation of inoculated *Listeria monocytogenes*, natural populations of lactic acid bacteria, *Pseudomonas* spp., and coliforms and their recovery during storage at 4 and 10 °C. *J. Food Prot.* **2018**, *81*, 1245–1251. [CrossRef]
102. Evert-Arriagada, K.; Trujillo, A.; Amador-Espejo, G.; Hernández-Herrero, M. High pressure processing effect on different *Listeria* spp. in a commercial starter-free fresh cheese. *Food Microbiol.* **2018**, *76*, 481–486. [CrossRef]
103. Misiou, O.; van Nassau, T.J.; Lenz, C.A.; Vogel, R.F. The preservation of *Listeria*-critical foods by a combination of endolysin and high hydrostatic pressure. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, *266*, 355–362. [CrossRef]
104. Batty, D.; Meunier-Goddik, L.; Waite-Cusic, J.G. Camembert-type cheese quality and safety implications in relation to the timing of high-pressure processing during aging. *J. Dairy Sci.* **2019**, *102*, 8721–8733. [CrossRef] [PubMed]
105. Stratakos, A.C.; Inguglia, E.S.; Linton, M.; Tollerton, J.; Murphy, L.; Corcionivoschi, N.; Koidis, A.; Tiwari, B.K. Effect of high pressure processing on the safety, shelf life and quality of raw milk. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2019**, *52*, 325–333. [CrossRef]
106. Bambace, M.F.; Moreira, R.; Sánchez-Moreno, C.; Ancos, B.D. Effects of combined application of high-pressure processing and active coatings on phenolic compounds and microbiological and physicochemical quality of apple cubes. *J. Sci. Food Agric.* **2021**, *101*, 4256–4265. [CrossRef] [PubMed]
107. Cava, R.; Higuero, N.; Ladero, L. High-pressure processing and storage temperature on *Listeria monocytogenes*, microbial counts and oxidative changes of two traditional dry-cured meat products. *Meat Sci.* **2021**, *171*, 108273. [CrossRef] [PubMed]
108. Valdramidis, V.P.; Patterson, M.F.; Linton, M. Modelling the recovery of *Listeria monocytogenes* in high pressure processed simulated cured meat. *Food Control* **2015**, *47*, 353–358. [CrossRef]
109. Zagorska, J.; Galoburda, R.; Raita, S.; Liepa, M. Inactivation and recovery of bacterial strains, individually and mixed, in milk after high pressure processing. *Int. Dairy J.* **2021**, *123*, 105147. [CrossRef]
110. Jofré, A.; Aymerich, T.; Bover-Cid, S.; Garriga, M. Inactivation and recovery of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* after high hydrostatic pressure treatments up to 900 MPa. *Int. Microbiol.* **2010**, *13*, 105–112. [CrossRef]
111. Jarzynka, S.; Strom, K.; Barbarska, O.; Pawlikowska, E.; Rosiak, E.; Oledzka, G.; Wesolowska, A. Combination of High-Pressure Processing and Freeze-Drying as the Most Effective Techniques in Maintaining Biological Values and Microbiological Safety of Donor Milk. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *18*, 2147. [CrossRef]
112. Pérez-Baltar, A.; Serrano, A.; Medina, M.; Montiel, R. Effect of high pressure processing on the inactivation and the relative gene transcription patterns of *Listeria monocytogenes* in dry-cured ham. *LWT* **2021**, *139*, 110555. [CrossRef]
113. Raghubeer, E.V.; Phan, B.N.; Onuoha, E.; Diggins, S.; Aguilar, V.; Swanson, S.; Lee, A. The use of High-Pressure Processing (HPP) to improve the safety and quality of raw coconut (*Cocos nucifera* L) water. *Int. J. Food Microbiol.* **2020**, *331*, 108697. [CrossRef]
114. Baptista, I.; Rocha, S.M.; Cunha, Â.; Saraiva, J.A.; Almeida, A. Inactivation of *Staphylococcus aureus* by high pressure processing: An overview. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2016**, *36*, 128–149. [CrossRef]
115. Hnosko, J.; San-Martin Gonzalez, M.; Clark, S. High-pressure processing inactivates *Listeria innocua* yet compromises Queso Fresco crumbling properties. *J. Dairy Sci.* **2012**, *95*, 4851–4862. [CrossRef] [PubMed]
116. Hereu, A.; Bover-Cid, S.; Garriga, M.; Aymerich, T. High hydrostatic pressure and biopreservation of dry-cured ham to meet the Food Safety Objectives for *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *154*, 107–112. [CrossRef] [PubMed]
117. Martínez-Rodríguez, Y.; Acosta-Muñiz, C.; Olivas, G.I.; Guerrero-Beltrán, J.; Rodrigo-Aliaga, D.; Sepúlveda, D.R. High hydrostatic pressure processing of cheese. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2012**, *11*, 399–415. [CrossRef]
118. Kheadr, E.E.; Vachon, J.; Paquin, P.; Fliss, I. Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* **2001**, *12*, 435–446. [CrossRef]
119. Evert-Arriagada, K.; Hernández-Herrero, M.; Juan, B.; Guamis, B.; Trujillo, A. Effect of high pressure on fresh cheese shelf-life. *J. Food Eng.* **2012**, *110*, 248–253. [CrossRef]
120. Fleischmann, S.; Robben, C.H.; Alter, T.; Rossmanith, P.; Mester, P. How to evaluate nongrowing cells—Current strategies for determining antimicrobial resistance of VBNC bacteria. *Antibiotics* **2021**, *10*, 115. [CrossRef]
121. Pinto, D.; Santos, M.A.; Chambel, L. Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms. *Crit. Rev. Microbiol.* **2015**, *41*, 61–76. [CrossRef]
122. Zhao, X.H.; Li, M.; Xu, Z.B. Detection of foodborne pathogens by surface enhanced raman spectroscopy. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1236. [CrossRef]
123. Zhao, X.H.; Yu, Z.X.; Xu, Z.B. Study the features of 57 confirmed CRISPR Loci in 38 strains of *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1591. [CrossRef]
124. Aurass, P.; Prager, R.; Flieger, A. EHEC/EAEC O104:H4 strain linked with the 2011 German outbreak of hemolytic uremic syndrome enters the viable but non-culturable state in response to various stresses and resuscitates upon stress relief. *Environ. Microbiol.* **2011**, *13*, 3139–3148. [CrossRef] [PubMed]

125. Bull, M.K.; Hayman, M.M.; Stewart, C.M.; Szabo, E.A.; Knabel, S.J. Effect of prior growth temperature, type of enrichment medium, and temperature and time of storage on recovery of *Listeria monocytogenes* following high pressure processing of milk. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *101*, 53–61. [CrossRef] [PubMed]
126. Koseki, S.; Yamamoto, K. Modelling the bacterial survival/death interface induced by high pressure processing. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *116*, 136–143. [CrossRef] [PubMed]
127. Nakaura, Y.; Morimatsu, K.; Inaoka, T.; Yamamoto, K. *Listeria monocytogenes* cells injured by high hydrostatic pressure and their recovery in nutrient-rich or -free medium during cold storage. *High Press Res.* **2019**, *39*, 324–333. [CrossRef]
128. Pérez-Baltar, A.; Alía, A.; Rodríguez, A.; Córdoba, J.J.; Medina, M.; Montiel, R. Impact of water activity on the inactivation and gene expression of *Listeria monocytogenes* during refrigerated storage of pressurized dry-cured ham. *Foods* **2020**, *9*, 1092. [CrossRef]
129. Kannan, S.; Balakrishnan, J.; Govindasamy, A. *Listeria monocytogenes*—Amended understanding of its athogenesis with a complete picture of its membrane vesicles, quorum sensing, biofilm and invasion. *Microb. Pathog.* **2020**, *149*, 104575. [CrossRef]
130. Wei, L.N.; Shi, C.Z.; Luo, C.X.; Hu, C.H.Y.; Meng, Y.H. Phloretin inhibits biofilm formation by affecting quorum sensing under different temperature. *LWT* **2020**, *131*, 109668. [CrossRef]
131. Ferreira, V.; Wiedmann, M.; Teixeira, P.; Stasiewicz, M.J. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: Epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *J. Food Prot.* **2014**, *77*, 150–170. [CrossRef]
132. Wemekamp-Kamphuis, H.H.; Wouters, J.A.; De Leeuw, P.P.L.A.; Hain, T.; Chakraborty, T.; Abee, T. Identification of sigma factor σB-controlled genes and their impact on acid stress, igh hydrostatic pressure, and freeze survival in *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 3457–3466. [CrossRef]
133. Rantsiou, K.; Greppi, A.; Garosi, M.; Acquadro, A.; Mataragas, M.; Cocolin, L. Strain dependent expression of stress response and virulence genes of *Listeria monocytogenes* in meat juices as determined by microarray. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *152*, 116–122. [CrossRef]
134. Liu, Y.; Orsi, R.H.; Gaballa, A.; Wiedmann, M.; Boor, K.J.; Guariglia-Oropeza, V. Systematic review of the *Listeria monocytogenes* σB regulon supports a role in stress response, virulence and metabolism. *Future Microbiol.* **2019**, *14*, 801–828. [CrossRef] [PubMed]
135. Chaturongakul, S.; Raengpradub, S.; Wiedmann, M.; Boor, K.J. Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol.* **2008**, *16*, 388–396. [CrossRef] [PubMed]
136. Sue, D.; Boor, K.J.; Wiedmann, M. SigmaB -dependent expression patterns of compatible solute transporter genes opuCA and lmo1421 and the conjugated bile salt hydrolase gene *bsh* in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* **2003**, *149*, 3247–3256. [CrossRef] [PubMed]
137. Bowman, J.P.; Bittencourt, C.R.; Ross, T. Differential gene expression of *Listeria monocytogenes* during high hydrostatic pressure processing. *Microbiology* **2008**, *154*, 462–475. [CrossRef]
138. Schrama, D.; Helliwell, N.; Neto, L.; Faleiro, M.L. Adaptation of *Listeria monocytogenes* in a simulated cheese medium: Effects on virulence using the *Galleria mellonella* infection model. *Lett. Appl. Microbiol.* **2013**, *56*, 421–427. [CrossRef]
139. Montiel, R.; Quesille-Villalobos, A.; Alessandria, V.; Medina, M.; Cocolin, L.S.; Rantsiou, K. Antilisterial effect and influence on *Listeria monocytogenes* gene expression of enterocin or *Enterococcus faecalis* in sliced dry-cured ham stored at 7 °C. *J. Food Prot.* **2019**, *82*, 1598–1606. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Olsztyn, dn. 08.06.2026 r.
(miejscowość, data)

mgr inż. Patryk Wiśniewski
(imię i nazwisko kandydata)
Technologia żywności i żywienia
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE
autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: *Impact of High-Pressure Processing (HPP) on Listeria monocytogenes – An Overview of Challenges and Responses* (Wiśniewski, P., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2024). *Impact of High-Pressure Processing (HPP) on Listeria monocytogenes – An Overview of Challenges and Responses*. Foods, 13, 14. https://doi.org/10.3390/foods13010014) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich dyskusji na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny).

Wiśniewski Patryk
(podpis kandydata)

Olszty, dn. 08.06.2026 r.
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem *Impact of High-Pressure Processing (HPP) on Listeria monocytogenes – An Overview of Challenges and Responses* (Wiśniewski, P., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2024). *Impact of High-Pressure Processing (HPP) on Listeria monocytogenes – An Overview of Challenges and Responses*. Foods, 13, 14. https://doi.org/10.3390/foods13010014) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: współtworzeniu koncepcji i metodologii badań, dokonaniu krytycznej rewizji i redakcji manuskryptu oraz sprawowaniu nadzoru naukowego.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Patryka Wiśniewskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Patryka Wiśniewskiego polegający na: udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich dyskusji na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny).

Wioleta Chajęcka-Wierzchowska

.....
podpis

Olsztyn, dn. 08.06.2026 r.
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Anna Zadernowska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem *Impact of High-Pressure Processing (HPP) on Listeria monocytogenes – An Overview of Challenges and Responses (*Wiśniewski, P., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2024). *Impact of High-Pressure Processing (HPP) on Listeria monocytogenes – An Overview of Challenges and Responses*. Foods, 13, 14. https://doi.org/10.3390/foods13010014) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: współtworzeniu koncepcji badań, zbieraniu i analizie danych literaturowych, recenzji i redakcji manuskryptu, sprawowaniu nadzoru naukowego nad projektem oraz pozyskaniu finansowania niezbędnego do realizacji badań.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Patryka Wiśniewskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Patryka Wiśniewskiego polegający na: udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich dyskusji na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny).

Anna Zadernowska
.....
podpis

Załącznik nr 5

Publikacja P5

Wiśniewski, P., Zadernowska, A. (2026). Application of pascalisation in the control of *Listeria* sp. in beverages – Effectiveness, limitations, and future prospects. *Food Microbiology*, 134, 104932. https://doi.org/10.1016/j.fm.2025.104932.

MNiSW – 140; IF – 4.6; WoS – 0; GS – 0; RG – 0

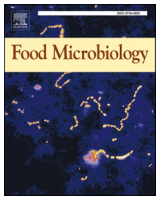
Food Microbiology 134 (2026) 104932



Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm



Review



Application of pascalisation in the control of *Listeria* sp. in beverages – Effectiveness, limitations, and future prospects

Patryk Wiśniewski *, Anna Zadernowska

Department of Food Microbiology, Meat Technology and Chemistry, Faculty of Food Science, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:
High-pressure processing
Juices
Food pathogens
Listeria monocytogenes
Listeria innocua

ABSTRACT

Pascalisation is one of the non-thermal methods for reducing contamination of beverages with *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. This article examines the effectiveness of pascalisation in eliminating these bacteria in beverages, analyzing the impact of process parameters (pressure value, dwell time, temperature), its limitations, and the potential for synergy with other methods based on studies from the Scopus and Web of Science databases. Although industrial applications typically use the pressure of 600 MPa, many studies have reported bacterial inactivation at lower pressures. Reducing the pressure in pascalisation may seem advantageous for preserving the product's sensory qualities, but it does not necessarily ensure appropriate microbiological safety. This is due to the barotolerance of some *Listeria* sp. strains, the risk of forming viable but non-culturable cells (VBNC) undetectable by standard methods, and the possibility of microbial regrowth after processing. Additionally, high pressure, acting as a stressor, induces DNA damage and the SOS response and increases cell membrane permeability, affecting changes and transfer of antibiotic resistance genes (ARG). Growing market demand for plant-based, minimally processed beverages drives the search for economically viable solutions that combine high-pressure processing with other preservation methods. Current research explores combining pascalisation with different hurdles to reduce pressure requirements without compromising microbiological safety. Nevertheless, acidic matrices remain more suitable than neutral or antioxidant-rich formulations, which show decreased bacterial inactivation. Future research should refine pascalisation parameters for various beverage types and explore synergistic preservation strategies to ensure appropriate microbiological quality while preserving sensory and nutritional properties.

1. Introduction

The microbiological safety of food, including beverages, is a key aspect of public health and food product quality (Lorenzo et al., 2018). Bacteria, including pathogens, can enter beverages at various stages of production and distribution. Their presence in liquid products, especially those not subjected to traditional thermal pasteurization, can pose a significant risk to consumers (Nesterova et al., 2024).

In recent years, there has been a growing demand for minimally processed plant and vegetable products that retain their natural flavor, nutritional value, and bioactive properties (Gomes et al., 2023). While effective at eliminating microorganisms, traditional preservation methods such as pasteurization and heat sterilization often compromise sensory quality and reduce nutrient content (Rahman, 2020). To meet the diverse expectations of consumers, the food industry has integrated advanced processing techniques like pulsed electric field (PEF), ultrasound treatment, irradiation, and pascalisation into food manufacturing (Lee et al., 2024), which aim to ensure microbiological safety while preserving, for example, the fresh-like quality of plant-based foods.

The global non-thermal food processing market was valued at USD 180 billion in 2024 and is projected to reach USD 250 billion by 2033, exhibiting a compound annual growth rate (CAGR) of 4.0 % from 2026 to 2033. This growth is driven by increasing consumer demand for healthier, minimally processed food products (Markwide Research Report, 2025).

One of the most important methods in this category is pascalisation (also known as high-pressure processing; HPP). In pascalisation, commercial applications apply pressure ranging from 100 to 600 MPa. This pressure is instantly and uniformly distributed throughout the product, whether packaged or unpackaged, with the help of a pressure-transmitting medium (PTM) (Pinto et al., 2020; Sehrawat et al.,

* Corresponding author. Plac Cieszyński 1, 10-726, Olsztyn, Poland.
E-mail address: patryk.wisniewski@uwm.edu.pl (P. Wiśniewski).

https://doi.org/10.1016/j.fm.2025.104932
Received 12 May 2025; Received in revised form 30 June 2025; Accepted 16 September 2025
Available online 16 September 2025
0740-0020/© 2025 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

2021). This method efficiently reduces or inactivates food spoilage pathogens and microorganisms while maintaining beverages' flavor, aroma, color, and nutritional quality (Abera, 2019). Although 600 MPa is often cited as a maximum, in practice many HPP processes use somewhat lower pressures with longer holds to balance safety, quality and cost. Research shows that moderate pressures (ca. 350–550 MPa) can still achieve the required log-reductions of spoilage/pathogenic microbes (Koutsoumanis et al., 2022). Crucially, these milder treatments are gentler on the product – for example, runs at ~345–480 MPa induce far fewer texture, color and flavor changes than harsher 600 MPa cycles (Akwu et al., 2024). Operating at reduced pressure also requires less energy and causes less mechanical wear (Hiperbaric, 2022; Akwu et al., 2024) a significant saving given HPP's high capital and energy costs (Shankar, 2014; Sehrawat et al., 2021). In practice, food technologists select the appropriate pressure/time profile for each product: if the product has a low initial microorganism content or is highly acidic, slightly lower pressure/longer cycle times can ensure safety while maximizing sensory quality and reducing costs (Woldemariam and Emire, 2019).

HPP-treated products such as juices (Pérez-Lamela et al., 2021; Rosenthal et al., 2018; Szczepańska, 2017; Wachowicz, 2019), vegetables (Houška et al., 2022), meat (Bolumar et al., 2021), dairy (Ozaybi, 2024), and seafood (Campus, 2010) are now widely available in retail. In Europe, key markets like Germany, France, and the UK have driven especially dynamic growth in HPP-treated juices, underpinned by strict food-safety regulations and a strong consumer preference for "clean--label" beverages (Business Research Insights, 2025).

Moreover, the wider European HPP equipment market, which largely serves juice producers, reached a value of USD 886.16 million in 2023 and is forecast to grow at a CAGR of 12.6 % between 2024 and 2030, exceeding USD 2 billion by the end of the decade (Virtue Market Research, 2024). Germany alone accounts for approximately 18 % of this equipment market, followed by the rest of Europe (32 %), France (14 %), Spain (13 %), the UK (12 %), and Italy (11 %), reflecting the broad-based investment in HPP across the region (Virtue Market Research, 2024).

The effectiveness of pascalisation in microbial reduction is driving its growing popularity in the food industry (Jermann et al., 2015; Nabi et al., 2021; Raghubeer et al., 2020). Due to current regulations in various countries, HPP is recognized as a method that achieves a safe level of reduction of vegetative pathogens, such as *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* sp., and *L. monocytogenes*, in fruit juices (Raghubeer et al., 2020). Similarly, HPP is used in many other countries, such as Canada (Canadian Food Inspection Agency, n.d.) and the European Union (Koutsoumanis et al., 2022), to ensure the safety of raw, uncooked fruit juices and other food products.

One of the major threats in the food industry is pathogens, including *L. monocytogenes* (responsible for listeriosis), which can survive and multiply even under refrigerated conditions (Tasara and Stephan, 2006). Although traditionally antibiotic-susceptible, an increasing number of multidrug-resistant *L. monocytogenes* strains have been reported, making continuous monitoring of antibiotic resistance essential – particularly in ready-to-eat (RTE) foods such as beverages (Olaimat et al., 2018). In the context of juices (including HPP-treated juices), the presence of *L. monocytogenes* can pose a serious risk to consumers, especially in minimally processed juices, which are more susceptible to contamination, and which require handling under special (refrigerated) conditions (Zhu et al., 2017). Moreover, recent regulatory changes have further emphasized the need for strict control of *L. monocytogenes* in food products. The European Commission's Regulation (EU) 2024/2895 (Commission Regulation, 2024), amending Regulation (EC) No 2073/2005, reinforced *L. monocytogenes* as a food safety criterion due to a concerning rise in listeriosis cases across the EU (European Centre for Disease Prevention and Control ECDC, 2024) In response to this public health threat, stricter microbiological criteria now mandate the absence of *L. monocytogenes* in 25 g of ready-to-eat foods throughout their shelf life, unless producers can demonstrate that the pathogen will not exceed 100 CFU/g. This regulation highlights the importance of enhanced monitoring and preventive measures, especially for minimally processed products such as HPP-treated juices, which require rigorous safety assessments to reduce the risk of contamination.

L. monocytogenes is a growing threat to the food industry, especially in RTE foods, including beverages, due to its increasing antibiotic resistance. Although it is generally antibiotic-susceptible, an increasing number of multidrug-resistant strains are being reported, making continuous monitoring of antibiotic resistance in this genus essential (Olaimat et al., 2018).

Fruit juices, especially unpasteurized or minimally processed types, can provide a permissive environment for the Survival – and in some cases, limited growth – of *L. monocytogenes* under certain conditions, such as higher pH levels or temperature abuse (Caggia et al., 2009; Ziegler et al., 2018; Bainotti et al., 2025). Infections caused by this pathogen can be serious, with significant mortality, especially among vulnerable populations such as the elderly, pregnant women, and immunocompromised individuals (European Food Safety Authority European Centre for Disease Prevention and Control, 2024) . This is reflected in the rise of reported cases of listeriosis in the EU, with 2023 witnessing the highest number of cases (n = 2952; a 5.8 % increase compared to 2022) (European Food Safety Authority European Centre for Disease Prevention and Control, 2024) and notification rate of listeriosis since the start of EU-level surveillance in 2007. Listeriosis was the fifth most reported zoonosis in humans in the EU that year and is considered one of the most serious food-borne diseases under EU surveillance due to its high hospitalization rate, as well as increased morbidity and mortality, particularly among the elderly (Quereda et al., 2021; (European Food Safety Authority European Centre for Disease Prevention and Control, 2024). Despite these concerning trends, sampling of 'ready-to-eat' foods, including juices, revealed relatively low contamination levels (European Food Safety Authority European Centre for Disease Prevention and Control, 2024). However, the rise in reported cases emphasizes the need for vigilance and stringent hygiene protocols.

Among *L. monocytogenes* strains, different sensitivity to HPP-induced stress is encountered (Duru et al., 2021; Hwang et al., 2023; Wiśniewski et al., 2023b), which is another problem associated with using this technology. Studies have shown that although HPP in the range of 400–600 MPa effectively inactivates many pathogens, *L. monocytogenes* can survive and regenerate even after exposure to high pressure (Wiśniewski et al., 2023b), especially in low-temperature environments such as carrot juice storage at 4 °C (Hwang et al., 2023). In the survival analyses of *Listeria* sp., a second species, *L. innocua*, is also used mainly due to its lack of pathogenicity. *L. innocua* is frequently employed as a model organism in studies on the effectiveness of preservation methods, including HPP and its growth, biochemical characteristics, physiology, and metabolism are similar to those of *L. monocytogenes* (Kamat and Nair, 1996; Friedly et al., 2008). Therefore, regular monitoring and adherence to strict microbiological standards in beverage production is key to ensuring consumer safety (Hua and Zhu, 2024).

This review presents the effectiveness of pascalisation in eliminating *L. monocytogenes* and its model counterpart, *L. innocua*, in various beverages. The impact of the various parameters of this technology, its limitations, and the potential for synergistic combination with other preservation methods are discussed. The analysis was based on research available in Scopus and Web of Science databases.

2. Materials and methods

The review was conducted following the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines to ensure effective preparation (Page et al., 2021).

A collection of scientific publications from two databases (Table S1) – Web of Science and Scopus – was searched to ensure the originality of scientific studies that focused directly on characterizing the effects of

pasteurization on *L. monocytogenes* and *L. innocua* in beverages. The following were used as inclusion criteria: (1) Original research manuscripts published in 2014–2024; (2) HPP as a food preservation method technology; (3) *L. monocytogenes* and *L. innocua* as the main microorganisms; (4) Research environment – different types of beverages. The following were used as exclusion criteria: (1) Other than original research (reviews, case reports, comments, and letters); (2) Different technology than pascalisation; (3) Different species than *L. monocytogenes* or *L. innocua*; (4) Different products than beverages; (5) Texts written in a language other than English. Search terms "Pascalisation" OR "Pascalization" OR "High-Pressure Processing" OR "HPP" OR "High Pressure Technology" OR "HHP" AND "Beverages" OR "Drink Processing" OR "Beer" OR "Dairy Beverages" OR "Fermented Milk Beverages" OR "Juice" OR "Soft Drinks" OR "Wine" OR "Yoghurt" OR "Kefir" AND "*Listeria monocytogenes*" OR "*L. monocytogenes*" OR "*Listeria innocua*" OR "*L. innocua*" after removing duplicates from the databases, yielded 114 results, and the inclusion criteria were met in 29 cases. A search of databases and analysis of the literature yielded primary original scientific papers focusing on the effectiveness of pasteurization on *L. monocytogenes* and *L. innocua* in beverages (Aganovic et al., 2016; Alcantara-Zayala et al., 2018; Ali et al., 2020; Bambace et al., 2021; Bucur et al., 2020; Cheng et al., 2024; Fernandez et al., 2020; Gonzalez-Tejedor et al., 2023; Gouvea et al., 2020; Hwang et al., 2023; Leong et al., 2024; Nasilowska et al., 2018, 2019; 2018; Petrus et al., 2019; Petrus et al., 2020; Petrus et al., 2020a; Pokhrel et al., 2022; Raghubeer et al., 2020; Rodrigues-Petrus et al., 2020; Scolari et al., 2015; Shahbaz et al., 2016; Sokolowska et al., 2014; Usaga et al., 2021; Wiśniewski et al., 2024; Zacconi et al., 2015). A summary of the selection process for all publications reviewed for the study has been provided in Fig. 1.

The titles and abstracts of the retrieved articles were independently reviewed by the author (P.W.), and any difference of opinion was remedied through dialogue between the second author (A.Z.).

3. Effect of pascalisation parameters on inactivation efficiency of *L. monocytogenes* and *L. innocua*

The effectiveness of pascalisation in reducing the number and presence of *Listeria* sp. in beverages is highly dependent on key processing parameters, including pressure level, processing duration, and temperature, as well as strain species (Wiśniewski et al., 2023b) – for *L. monocytogenes* (Table 1) and *L. innocua* (Table 2). These factors affect the degree of cell damage, protein denaturation, and membrane damage in bacterial cells (Ferreira et al., 2016). While pressures above 400 MPa are generally enough to effect a significant reduction in *Listeria* sp., lower pressures may cause only limited inactivation, enabling the bacteria to survive or potentially recover during storage (Hwang et al., 2023). In addition, the duration of processing plays a key role in ensuring total microbial reduction, especially at moderate pressure levels (Riekkinen et al., 2023).

3.1. Effect of pressure and duration of treatment

The pressure applied to the food product during the pascalisation process is the main factor responsible for the inactivation of *Listeria* sp. However, the effectiveness of this method depends on the level of pressure applied (Aganovic et al., 2016; Alcantara-Zayala et al., 2018; Ali et al., 2020; Bambace et al., 2021; Bucur et al., 2020; Cheng et al., 2024; Fernandez et al., 2020; Gonzalez-Tejedor et al., 2023; González-Tejedor et al., 2023; Gouvea et al., 2020; Hwang et al., 2023; Leong et al., 2024; Nasilowska et al., 2019; 2018; Petrus et al., 2019; Petrus et al., 2020; Petrus et al., 2020a; Pokhrel et al., 2022; Raghubeer et al., 2020; Rodrigues-Petrus et al., 2020; Scolari et al., 2015; Shahbaz et al., 2016; Sokolowska et al., 2014; Usaga et al., 2021; Wiśniewski et al., 2024; Zacconi et al., 2015).

Pressure levels ≤300 MPa generally do not provide effective elimination (elimination as a ≥5 log CFU/ml reduction) of *L. monocytogenes* and may lead to only a partial reduction in the population, and in some cases, the bacteria may recover during storage (Bucur et al., 2020; Gonzalez-Tejedor et al., 2023; Gouvea et al., 2020; Hwang et al., 2023 ;

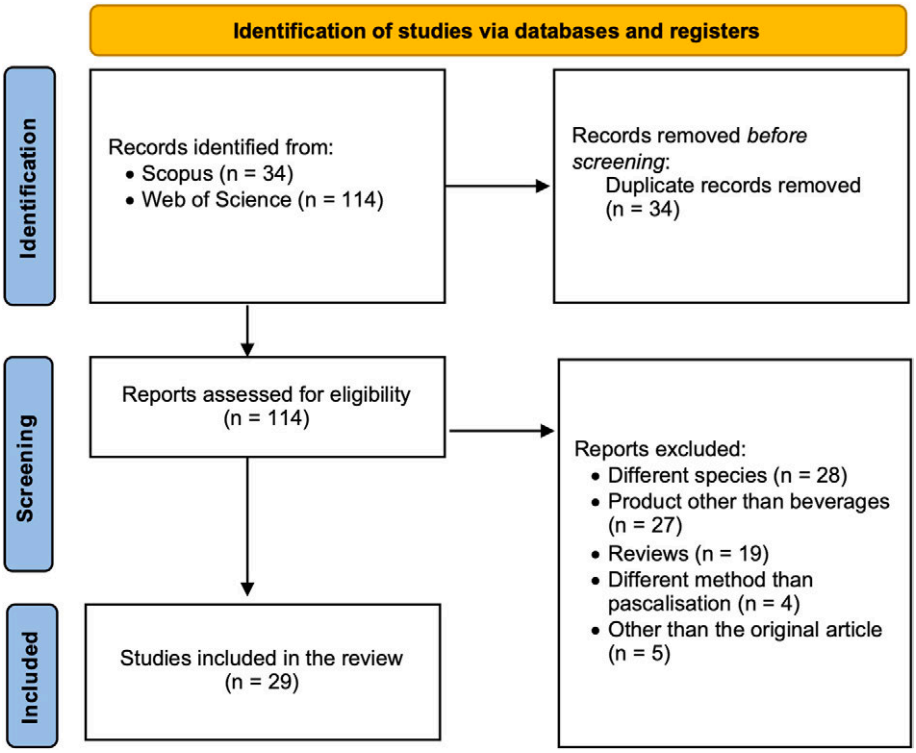


Fig. 1. Diagram showing the process of selecting articles for research.

Table 1
Effectiveness of pascalisation in reducing *L. monocytogenes* in various types of beverages.

No	Type of Beverage	Method	Parameters	Initial counts (log CFU/mL)	Effect of stress response on the reduction rate	Beverage Quality After HPP	Conclusions	Literature
1.	Apple juice	HPP and dimethyl decarbonate (DMDC)	Pressure – ranging from 100 MPa to 600 MPa Dwell time – from 26 s to 194 s Temperature – ND DMDC – from 116 mg/L to 250 mg/L	6.40	Total reduction	NA	DMDC at low concentrations can be safely added to apple juice to reduce the parameters conventionally applied in HPP	Petrus et al. (2020a)
2.	Apple juice	HPP	Pressure – 139 MPa[1], 201 MPa[2], 350 MPa[3], 499 MPa[4], 561 MPa[5] Dwell times – 39 s[3], 60 s[2,4], 110 s[1,3,5], 160 s[2,3], 181 s[3] Temperature – ND	6.40	- Total reduction for parameters: 499 MPa/60 s, 350 MPa/160 s, 350 MPa/110 s, 561 MPa/110 s, 350 MPa/181 s. - Some reduction for parameters: 201 MPa/60 s (0.60 log reduction), 201 MPa/160 s (0.80 log reduction), 139 MPa/110 s (0.40 log reduction), 350 MPa/39 s (1.10 log reduction)		Pressures above 490 MPa were most effective, while 350 MPa (>110 s) achieved >5.00 log CFU/mL reduction for *L. monocytogenes*. Pressures above 400 MPa ensured >5.00 log CFU/mL reduction in all pathogens. The combination of HPP and acidic pH (3.76) enhanced pathogen inactivation	Rodrigues Petrus et al. (2020)
3.	Cucumber juice	HPP	Pressure – 300 MPa and 400 MPa Dwell time – 8 min Temperature – 8 °C	~7.00	- At 300 MPa, the reduction was less than 1.00 log CFU/mL, whereas at 400 MPa, - significant strain-dependent reduction was observed: 6.00 log CFU/mL for *L. monocytogenes* Scott A and 5.00 log CFU/mL for *L. monocytogenes* RO15		To ensure microbial safety during extended storage, combining HPP with additional antimicrobial strategies is recommended	Bucur et al. (2020)
4.	Apple, orange, and grape juices	HPP and pH	Pressure – 550 MPa Dwell time – 1 min Temperature – 5 °C pH – 4.00, 4.50, 5.00	7.00	HPP achieved more than a 5.00 log CFU/mL reduction of *L. monocytogenes* in all juice types and conditions tested		Lower pH levels enhanced HPP effectiveness against *L. monocytogenes*, but only acetic acid achieved a >5.00 log CFU/mL reduction	Cheng et al. (2024)
5.	Smoothies –Fresh fruit and vegetables	HPP	Pressure – 300 MPa[1], 350 MPa[2], 400 MPa[3], 450 MPa[4] Dwell time – 4 min[3,4], 6 min[2], 11 min[1] Temperature – 20 °C	8.00	- Reduction of 5.00 log CFU/mL reduction at 300 MPa - Reduction of >6.00 log CFU/mL reduction at higher tested pressures	HHP significantly affected all quality attributes except TPC	HPP is an effective method for inactivating *L. monocytogenes* in fresh fruit and vegetable beverages while preserving their sensory and nutritional quality	Gonzalez-Tejedor et al. (2023)
6.	Açaí juices	HPP	Pressure – 300 MPa[1], 400 MPa[2], 400 MPa[3], 600 MPa[4] Dwell time – 3 min[1], 1 min[2], 3 min[3,4] Temperature – 5 °C	7.54	- Reduction of >6.00 log CFU/mL at 400 MPa/1 min - Reduction of <5.00 log CFU/mL at 300 MPa/1 min	NA	Using milder HPP conditions may improve economic viability by reducing equipment depreciation and maintenance costs while maintaining safety margins. Higher pressure and temperature from adiabatic heating can affect bioactive compounds	Gouvea et al. (2020)
7.	Carrot juice	HPP	Pressure – 200 MPa, 300 MPa, 400 MPa, 500 MPa, 600 MPa Dwell time – 3	7.00–8.00	– 200 MPa: No significant reduction, *Listeria* sp. remained viable – 300–400 MPa: Partial reduction, but *Listeria*	Maintained color, pH, taste, and nutritional content. No significant degradation of	*L. monocytogenes* in juice treated with HPP continued to grow during storage at 4 °C. Despite its low-pressure resistance, its ability to tolerate cold	Hwang et al. (2023)

(*continued on next page*)

Table 1 (*continued*)

No	Type of Beverage	Method	Parameters	Initial counts (log CFU/mL)	Effect of stress response on the reduction rate	Beverage Quality After HPP	Conclusions	Literature
			min Temperature – 23 °C		sp. survived and regrew during storage – 500–600 MPa: Complete inactivation (≥5.00 log CFU/mL reduction)	bioactive compounds.	allowed damaged or residual cells to recover and grow at low temperatures	
8.	Concord grape juice	HPP	Pressure – 319 MPa[1], 350 MPa[2], 425 MPa[3], 500 MPa[4], 531 MPa[5] Dwell time – 35 s[1], 60 s[2], 120 s[3], 180 s[4], 205 s[5] Temperature – ND	7.00	Total reduction	NA	*L. monocytogenes* did not grow in grape juice samples, either before or after HPP treatment	Petrus et al. (2020)
9.	Orange juice	HPP	Pressure – 401 MPa[1], 430 MPa[2], 500 MPa[3], 570 MPa[4], 599 MPa[5] Dwell time – 87 s[1], 120 s[2], 200 s[3], 280 s[4], 313 s[5] Temperature – 8 °C	7.30	Reduction of 7.30 CFU/mL		Moderate pressure of ~400 MPa and a short dwell time of ~200 s can effectively ensure the safety of orange juice	Petrus et al. (2020c)
10.	Raw coconut water	HPP	Pressure – 593 MPa Dwell time – 3 min Temperature – 4 °C	5.50–6.50	Reduction of <1.00 log CFU/mL		HPP-treated coconut water samples were microbiologically stable (<2 log CFU/mL) when stored at 4 °C	Raghubeer et al. (2020)
11.	Smoothies	HPP and temperature	Pressure −100 MPa[1], 130 MPa[2], 140 MPa[3], 160 MPa[4], 195 MPa[5], 200 MPa[6], 240 MPa[7], 280 MPa[8], 300 MPa[9] Dwell time – 300 s Temperature – −5°C[1,4,7,9], 5°C[8], 6°C[6], 15°C[3], 25°C[3], 35°C[4], 45°C[2,5,9]	6.00–7.00	Reduction of >5.00 log CFU/mL		Proper temperature selection allows cold pasteurization at pressures below 300 MPa, reducing costs and facilitating industrial application	Scolari et al. (2015)
12.	Apple juice (clarified)	HPP and TiO_2-UV Photocatalysis (TUVP)	Pressure – 0.1 MPa, 200 MPa, 400 MPa, 500 MPa, 600 MPa Dwell time – 1 min Temperature – 25 °C TUVP dose – 0 J/cm^2, 0.82 J/cm^2, 8.45 J/cm^2	7.10	- Reduction of 6.00 and 3.90 log CFU/mL using 0.82 and 8.45 J/cm2 TUVP treatments alone, respectively. - HHP at 200–300 MPa had little effect, but combining TUVP with higher pressures (400–600 MPa) significantly enhanced inactivation. - A synergistic effect was observed at 500–600 MPa, even with a low TUVP dose (0.82 J/cm^2). - Complete inactivation of *L. monocytogenes* was achieved using 8.45 J/cm^2 TUVP followed by 500 MPa HHP		This approach shows potential for liquid food preservation, though further studies are needed to assess its effectiveness across different food matrices and quality attributes	Shahbaz et al. (2016)
13.	Apple juice	HPP	Pressure – 400 MPa, 450 MPa, 475 MPa Dwell time – 1 min–7 min Temperature – 5 °C	7.50 ± 0.30	- The quantification limit was set at 25 CFU/mL (1.40 log CFU/mL). - When plate counts fell below this limit, a final population of 1.40 log CFU/mL was assigned		- Findings support validation studies and may aid in establishing safe harbors for HPP in the food industry. - Factors like acid adaptation and	Usaga et al. (2021)

(*continued on next page*)

Table 1 (*continued*)

No	Type of Beverage	Method	Parameters	Initial counts (log CFU/mL)	Effect of stress response on the reduction rate	Beverage Quality After HPP	Conclusions	Literature
					for a conservative estimate of log reductions. - *L. monocytogenes* was below the quantification limit in all tested juices and beverages after HPP and refrigerated storage. - Observed reductions for *L. monocytogenes* were conservatively estimated between >6.00 ± 0.30 and >6.20 ± 0.30 log CFU/mL		inoculum growth phase should be considered for *L. monocytogenes* inactivation in food safety regulations	
14.	Carrot juice	HPP	Pressure – 200 MPa, 400 MPa Dwell time – 5 min Temperature – 23 °C	>8.00	- At 200 MPa – reduction of 8.00 log CFU/mL. - At 400 MPa – reduction of 1.00 log CFU/mL, while others fell below the detection limit of the applied method		- *L. monocytogenes* resistance to HPP varies and depends on environmental conditions, especially the food matrix. - Protective properties of substrates like carrot juice enhance bacterial survival, even under inhibitory conditions. - Food components play a key role in bacterial stress responses and survival under extreme conditions	Wiśniewski et al. (2024)
15.	Smoothies	HPP and temperature	Pressure – 100 MPa–300 MPa Dwell time – ND Temperature (as a second method) – −5 °C–45 °C	8.00–9.00	HPP – reduction of >5.00 log CFU/mL cell reduction		- Pressure treatments were more effective than pasteurization, especially at −5 °C compared to 45 °C. - Both methods led to increased indigenous microbiota survivors after 15 days at 20 °C	Zacconi et al. (2015)

HPP – high pressure processing; TPC – Total phenolics content; ND – not data; NA – not applicable.

Pokhrel et al., 2022; Rodrigues-Petrus et al., 2020; Shahbaz et al., 2016). However, in some studies, the use of pascalisation treatment only in combination with appropriately selected temperature and increased process time was even observed for a a reduction below the plate-count detection limit of *L. monocytogenes* (Petrus et al., 2020a; Scolari et al., 2015; Zacconi et al., 2015) and *L. innocua* (Kieling et al., 2019), indicating that lower pressure alone is not adequate in ensuring the microbiological safety of beverages.

In carrot juice, 200 MPa for 5 min did not provide an effective reduction of *L. monocytogenes* – the bacteria were still detectable at above 8.00 log CFU/ml (Wiśniewski et al., 2024). In the same food matrix, in a study by Hwang et al. (2023) the same results were obtained – it was shown that the application of the same pressure value (200 MPa) for 3 min did not result in a significant reduction of *L. monocytogenes*, and the bacteria were able to survive and regenerate during storage. In apple juice, on the other hand, the application of 201 MPa/60s pressure only resulted in a reduction of 0.60 log CFU/ml, which means that the bacteria survived and could show a high potential for growth and recovery during storage (Rodrigues-Petrus et al., 2020).

Pressures in the 300–400 MPa range have moderate effects but do not always result in a a reduction below the plate-count detection limit of the bacterial population (Bucur et al., 2020; Del Rosario García-Mateos et al., 2019; Hwang et al., 2023; Nasilowska et al., 2019; Rodrigues-Petrus et al., 2020; Petrus et al., 2020a, 2020c). In a study by Bucur et al. (2020), the application of a pressure of 300 MPa/8 min resulted in a reduction of <1 log CFU/mL in cucumber juice, however, increasing the pressure value to 400 MPa (at the same time) achieved a 5-6-log reduction depending on the bacterial strain. On the other hand, a study by Hwang et al. (2023) showed that applying a pressure of 300 MPa to carrot juice only partially reduced the bacterial population, confirming the need for higher process parameters for products with neutral or slightly alkaline pH. Research by Rodrigues-Petrus et al. (2020) on apple juice showed that only a pressure of 350 MPa applied for at least 110 s achieves >5 log reduction of this pathogen, and when combined with an acidity of pH 3.76, the effect was even stronger.

Pressures in the range of 400–600 MPa show much better efficiency in the elimination of microorganisms and are often used in industrial practice (Aganovic et al., 2016; Alcantara-Zayala et al., 2018; Ali et al., 2020; Gonzalez-Tejedor et al., 2023; Hwang et al., 2023; Nasilowska et al., 2019; Petrus et al., 2020, Petrus et al., 2020a, 2020c; Raghubeer et al., 2020; Rodrigues-Petrus et al., 2020; Scolari et al., 2015; Shahbaz et al., 2016). In cucumber juice, the application of 400 MPa pressure for 8 min provided a 6-log reduction of *L. monocytogenes* Scott A, but only a 5-log reduction of strain RO15, indicating some differences in resistance between strains (Bucur et al., 2020). In contrast, in the vegetable-fruit smoothie, the application of 400 MPa pressure for only 1 min achieved effective reduction of the pathogen, but lower pressures were not effective in the elimination of *L. monocytogenes* (Gonzalez-Tejedor et al.,

Table 2
Effectiveness of pascalisation in reducing *L. innocua* in various types of beverages.

No	Type of Beverage	Method	Parameters	Initial counts (log CFU/mL)	Effect of stress response on the reduction rate	Beverage Quality After HPP	Conclusions	Literature
1.	Watermelon juice	HPP	Pressure – 600 MPa Dwell times – 3 min, 5 min Temperature – 20°C	8.83	Total reduction	NA	HPP enhances safety without significant quality loss, making it crucial for the fruit juice market	Aganovic et al. (2016)
2.	UHT milk	HPP and biopreservation (nisin)	Pressure – 350 MPa, 450 MPa, 550 MPa, 600 MPa Dwell times – ranging from come-up time (CUT) to 40 min Nisin – synthesized in situ by *Lactococcus lactis* Rif L+ (LUQ2)	7.00	- Reduction by LUQ2: decrease of 2.22 log CFU/mL, - HPP (550 MPa/2.5 min) + LUQ2 in raw milk: reduction by 3 log CFU/mL - HPP (550 MPa/2.5 min) in UHT milk: No detectable	Preserving the sensory and nutritional quality of milk	Promising strategy in increasing the effectiveness of *L. innocua.* inactivation in milk, which may help improve the microbiological safety of dairy products	Alcantara-Zayala et al. (2018)
3.	Wheatgrass juice	HPP and UV-C	Pressure – 400 MPa, 500 MPa, 600 MPa Dwell time – 60 s, 90 s, 180 s Temperature – 11°C UV-C – 254 nm	7.00	A 5.00 log CFU reduction was not achieved at 400 MPa; however, this level of inactivation was reached when applying 500 or 600 MPa for 60 s	HHP process would be preferentially selected over UV-C treatment based on increasing chlorophyll content and preserving antioxidants	While both UV-C and HHP are viable pasteurization alternatives, HHP is preferred as it enhances chlorophyll content and preserves antioxidants	Ali et al. (2020)
4.	Fruit and vegetable smoothie	HPP	Pressure – 630 MPa Dwell time – 6 min Temperature – 20°C	6.00–7.00	Reduction to 1.00 CFU/mL	No change in pH, color, taste or bioactive ingredients	While HPP effectively controlled *L. innocua* in fruit and vegetable smoothies for at least 12 days at 15 °C, its impact requires further evaluation to ensure product safety against this pathogen	Fernandez et al. (2020)
5.	Beetroot juice, Carrot juice	HPP	Pressure – 300 MPa[1], 400 MPa[2] Dwell time – 5 min[1,2], 10 min[1] Temperature – 20°C	6.00	Not specified	NA	The *L. innocua* can still propagate and regenerate during refrigeration. However, at 25°C, counts significantly declined between days 14 and 21, highlighting the importance of storage temperature in controlling *Listeria* sp. after HHP treatment	Nasilowska et al. (2018)
6.	Beetroot juice	HPP	Pressure – 200 MPa, 300 MPa, 400 MPa, Dwell time – 1 min, 5 min, 10 min. Temperature – 20 °C	6.00	Strain-dependent inactivation: 400 MPa for 1 min the collection strain of *L. innocua* was not detected, while the inactivation of the wild type of strain was 3.30 log CFU/mL		Wild *L. innocua* strains from beetroot juice are more resistant to HHP than collection strains. indicating potential adaptive resistance mechanisms	Nasilowska et al. (2019)
7.	Carrot-orange juice blend	HPP and pH	Pressure – 200 MPa, 300 MPa, and 400 MPa Dwell time – 1 min–5 min Temperature – 20°C pH – 4, 5, 6	7.00	– 200 MPa for 5 min – < 2.00 log CFU/mL at pH 5 and 6 but reached 3.22 log CFU/mL at pH 4. – 300 MPa for 2 min at pH 4; 400 MPa for 1 min at pH 5 or 400 MPa for 3 min at pH 6. – > 6.00 log CFU/mL		This study identifies optimal HPP conditions for extending juice shelf life at varying pH levels. Further research is needed to validate moderate HPP for pathogen inactivation, recovery during storage, and enzyme stability	Pokhrel et al. (2022)

(*continued on next page*)

Table 2 (*continued*)

No	Type of Beverage	Method	Parameters	Initial counts (log CFU/mL)	Effect of stress response on the reduction rate	Beverage Quality After HPP	Conclusions	Literature
8.	Beetroot juice	HPP	Pressure – 400 MPa Dwell time – 1 min, 5 min, 10 min Temperature – 20 °C	6.00–7.00	Reduction ranged from 3.90 log CFU/mL to 4.80 log CFU/mL, depending on initial concentration		Several factors affect *L. innocua* inactivation by hydrostatic pressure, including species, medium type, and pH	Sokolowska et al. (2014)
9.	Pitaya juice	Ozone and HPP	Pressure – 179 MPa[1], 200 MPa[2], 250 MPa[3], 300 MPa[4], 321 MPa[5] Dwell time – 5 min Temperature – 23.2–25.0 °C Ozonation time (24 mg O_3 L^{-1} of juice min^{-1} for 1.80[1], 3.00[2], 5.75[3], 8.50[4], 9.60[5] min	**7.60 ± 0.24**	Higher pressure and longer ozonation time lead to greater bacterial reduction, with the best effect (−6.20 log CFU/ml) achieved at 300 MPa and 8.5 min	The treatment caused a slight darkening and a slight loss of color intensity of the pitaya juice	The study found that the combination of ozonation and HHP had a synergistic effect on the inactivation of *L. innocua*, enabling the use of lower pressure levels	Del Rosario García-Mateos et al. (2019)
10.	Lemongrass-lime mixed beverage	HPP	Pressure – 200 MPa–400 MPa Dwell time – 1 min, 2 min Temperature – 25 °C	6.00	Total reduction (250 MPa/1 min)	HPP did not impact the vitamin C and phenolic content of the mixed lemongrass and lime drink. High-pressure non-thermal processing preserved the original bioactive compounds and physicochemical quality of the beverage more effectively than thermal pasteurization	Other preservation methods should be combined with HPP to enhance stability, prevent instability, and ensure the retention of bioactive compounds, as well as maintain the antioxidant activity of the mixed lemongrass and lime beverage until the end of its shelf life.	Kieling et al. (2019)
11.	Green juice (celery stalk, apple, cucumber, parsley)	HPP, TS snd nisin	Pressure – 400 MPa, 500 MPa, 600 MPa Dwell time – 3 min Temperature – 20 °C	7.00	Using HPP at 600 MPa for microorganism inactivation resulted in 5 and 7 log reductions of *L. innocua* when combined with 100 and 200 mg/L nisin, respectively. When TS at 60 °C was applied with 100 mg/L nisin, a 7 log reduction of *L. innocua* was observed after 3 min	Neither HPP nor TS affected the pH and total soluble solids; however, significant color changes were observed	These findings suggest that combining HPP or TS with nisin is a viable method for pasteurizing green juice	Oner (2020)
12.	Carrot juice	HPP, temperature and nisin	Pressure – 200 MPa, 300 MPa, 400 MPa, 500 MPa Dwell time – 2 min Temperature – 20 °C, 35 °C, 50 °C Nisin – 0 ppm, 25 ppm, 50 ppm	7.00	- At 500 MPa/2 min (20 °C) without nisin resulted in a 4-log CFU/mL reduction of *L. innocua*, whereas adding 25 ppm nisin at the same pressure and temperature led to a 7-log reduction.	Over a 4-week period, no significant changes were observed in color, total soluble solids (TSS), or turbidity, and there was no notable degradation of ascorbic acid, phenolic compounds, or carotenoid content.	The study results confirm the synergistic effect of HPP, nisin, and mild temperatures in inactivating *L. innocua* in carrot juice. Replacing HPP alone with this combination allows for lower pressures and shorter processing times for low-acidity juices, reducing energy requirements and increasing throughput.	Pokhrel et al. (2019)
13.	Pitaya juice	HPP	Pressure – 400 MPa[1], 430 MPa[2], 500 MPa[3], 570 MPa[4], 600 MPa[5] Dwell time – 11.3 min[1,3], 8.7	7.6 ± 0.4	550 MPa/16 min and 600 MPa/12 min treatments achieved 5-log reductions of *L. innocua* in pitaya juice	NA	HHP appears to be an effective nonthermal method for ensuring the microbiological safety and stability of pitaya juice	(Quiroz-González et al., 2018)

(*continued on next page*)

Table 2 (*continued*)

No	Type of Beverage	Method	Parameters	Initial counts (log CFU/mL)	Effect of stress response on the reduction rate	Beverage Quality After HPP	Conclusions	Literature
			min[2,4], 13.8 min[2,4], 15.0 min[3], 7.6 min[3], 11.3 min[5] Temperature – 19.5 ± 2.8 °C					
14.	Pineapple juice-coconut milk blend	HPP, nisin and pH	Pressure – 400 MPa[1], 500 MPa[2], 600 MPa[3] Dwell time – 0.5 min[1,2,3], 1 min, 1.5 min[2,3], 2 min,[2,3], 2.5 min[3], 5 min[3], 15 min[3], 30 min[3] Temperature – 20 °C Nisin – 50 ppm, 75, 100 ppm pH – 4.00, 5.00	7.00	– 400 MPa for 2 min resulted in a reduction of less than 3-log CFU/ml of *L. innocua* cells in coconut milk (pH 7) and PC mixture at pH 5. In contrast, a reduction of more than 3-log CFU/ml was achieved at pH 4. - At 500 MPa for 2 min, the reduction in *L. innocua* cells was less than 3-log CFU/ml, while a 5-log reduction was only achieved at 600 MPa applied for 30 min	The PC blends treated with HPP outperformed the samples treated with PEF and US in preserving ascorbic acid and maintaining color.	HPP in combination with other techniques is effective in fixing the product and maintaining the relevant quality characteristics	Yildiz et al. (2023)

HPP – high pressure processing; TS – thermosonication; NA – not applicable.

2023). Similarly, a study by Gouvea et al. (2020) on açaí berry juice showed that 400 MPa for 1 min was enough to achieve > 6-log pathogen reduction, which was comparable to the effect achieved at 600 MPa for 3 min. In beet juice, a pressure of 400 MPa/1 min was effective in reducing the *L. innocua* strain of the collection, but the foodborne strain strain (the strain recovered directly from beetroot juice) required as much as 10 min of treatment, suggesting that the wild-type strain possibly possesses and activates other adaptive mechanisms under pascalisation (Nasilowska et al., 2019).

Most studies have shown that the use of pressures above 500 MPa results in the complete elimination of *L. monocytogenes* and *L. innocua* below the detection limit (Ali et al., 2020; Cheng et al., 2024; Fernandez et al., 2020; Pokhrel et al., 2019; Raghubeer et al., 2020; Rodrigues-Petrus et al., 2020). In apple juice, a pressure of 561 MPa for 110 s completely reduced *L. monocytogenes* (Rodrigues-Petrus et al., 2020). In the case of the pascalisation of coconut water, a pressure of 593 MPa/3 min effectively reduced the level of *L. monocytogenes* to <1 CFU/ml, and the product remained microbiologically stable during storage (Raghubeer et al., 2020). In contrast, in vegetable-fruit smoothies, the minimum pressure required for full inactivation of *L. innocua* was 630 MPa for 6 min, with the product retaining its sensory properties (Fernandez et al., 2020). In wheatgrass juice, *L. innocua* ATCC 51742 was the most resistant strain among the microorganisms tested: 5-log reduction was only possible when pressure of 500–600 MPa was applied for 60 s (Ali et al., 2020).

3.2. Effect of temperature during pascalisation

The pascalisation and its effectiveness also depend on the process temperature (Possas et al., 2017; Wiśniewski et al., 2023a). The research reports that pascalisation conducted at low temperatures (4–8 °C) increases the effectiveness of pathogen inactivation and affects the ability of bacteria to recover from the treatment (Cheng et al., 2024; Petrus et al., 2020c; Raghubeer et al., 2020; Scolari et al., 2015; Usaga et al., 2021).

Bucur et al. (2020) showed that the application of 400 MPa for 8 min at 8 °C (cucumber juice) allowed a 5-6-log reduction of *L. monocytogenes* and further reduced the possibility of subsequent bacterial growth during 72-h cold storage. Raghubeer et al. (2020), analyzing coconut water subjected to pascalisation with a pressure of 593 MPa (3 min) at 4 °C, observed that the product was microbiologically stable throughout the storage period. Zacconi et al. (2015) indicated that combining HPP with below-zero temperatures (e.g., −5 °C) can further increase process efficiency. Low temperatures reduce the possibility of bacterial recovery, which is particularly important in products that have a longer cold storage time (Kaur and Yemmireddy, 2023). This is especially important from the perspective of *L. monocytogenes* and beverages produced using pascalisation, as these microorganisms are typically psychrotrophs with the ability to survive and grow during refrigerated food storage, as well as the fact that HPP-treated beverages need to be stored specifically under refrigerated conditions (Hwang et al., 2023; Teixeira et al., 2016).

Temperatures during the pascalisation process (>20 °C) can both improve the efficiency of *Listeria* sp. elimination and induce changes in the sensory quality of beverages (Gouvea et al., 2020; Nasilowska et al., 2019; Oner, 2020; Scolari et al., 2015). Scolari et al. (2015) showed that the application of 300 MPa at 45 °C in a berry smoothie allowed for a 5-log reduction of *L. monocytogenes* with less processing time than with standard HPP at 4 °C. A study by Nasilowska et al. (2019) on beetroot juice showed that 20 °C combined with 400 MPa was effective in eliminating bacteria, but at the same time could lead to unfavorable sensory changes, such as reduced color intensity. Gouvea et al. (2020) observed that higher temperatures can lead to the degradation of bioactive components, requiring precise optimization of the HPP process to preserve the health properties of beverages.

4. Efficiency and potential hazards of the pascalisation in different types of beverages

4.1. Efficiency of pascalisation

The effectiveness of pascalisation in reducing *L. monocytogenes* and *L. innocua* in beverages depends on several factors, including the type of

beverage, the pH value, the content of bioactive components (chemical composition of the matrix), and the process parameters used (pressure, holding time and temperature) (Tables 1 and 2) (Wiśniewski et al., 2023a). Low-pH products typically show higher bacterial inactivation efficiency compared to neutral-pH beverages.

4.1.1. Fruit juices

Fruit juices are one of the most studied products in the context of the effectiveness of pascalization in reducing *L. monocytogenes*. Their chemical composition, especially acidity (pH < 4.5), plays a key role in the synergistic effect of HPP on pathogens (Aganovic et al., 2016; Ali et al., 2020; Cheng et al., 2024; Fernandez et al., 2020; Gouvea et al., 2020; Kieling et al., 2019; Oner, 2020; Petrus et al., 2020, 2020, Petrus et al., 2020a, 2020; Rodrigues-Petrus et al., 2020; Shahbaz et al., 2016).

A study by Cheng et al. (2024) showed that in the case of apple juice, the application of a pressure of 550 MPa for 1 min allows for complete inactivation of *L. monocytogenes* (>5-log reduction). Similar results were obtained in a study by Rodrigues-Petrus et al. (2020)– the application of a pressure of 350 MPa for 110–181 s was sufficient to achieve complete inactivation of the pathogen in apple juice, especially when the pH of the beverage was 3.76. Moreover, the combination of HPP with the addition of dimethyl decarbonate (DMDC, 116–250 mg/L) allowed the reduction of the required pressure and time parameters, which may be beneficial in terms of economics and for the preservation of the sensory quality of the product (Petrus et al., 2020c).

Orange juice, like apple juice, has a relatively low pH (3.5–4.0), which favors the elimination of bacteria under pascalisation. A study by Petrus et al. (2020) indicates that pressures between 401 MPa and 599 MPa combined with treatment times from 87 to 313 s, effectively ensure the microbiological safety of orange juice. Specifically, a moderate pressure of around 400 MPa with a dwell time of approximately 200 s can be sufficient to achieve bacterial inactivation. These findings highlight the effectiveness of HPP in preserving orange juice while maintaining its safety and quality. Lower pressures, such as 300 MPa, may have been insufficient to fully inactivate the bacteria (Hwang et al., 2023). In the case of Concord grape juice, the use of pressures in the range of 319–531 MPa and a treatment time of 35–205 s led to the complete elimination of *L. monocytogenes*, indicating the high effectiveness of HPP in this type of product (Petrus et al., 2020).

Açaí juice, rich in bioactive components, required a pressure of at least 400 MPa to obtain a reduction in *L. monocytogenes* above 5-log (Gouvea et al., 2020). In this case, a pressure of 600 MPa applied for 3 min allowed for similar results as standard industrial conditions, suggesting that process parameters can be lowered to reduce production costs without compromising microbiological safety.

4.1.2. Vegetable juices

Vegetable juices, in contrast to fruit juices, have a higher pH value, which directly affects the effectiveness of the pascalisation: conventional pressures in the 300–400 MPa range often yield only partial reductions and allow bacterial recovery during storage (Bucur et al., 2020; Fernandez et al., 2020; Hwang et al., 2023; Nasilowska et al., 2018, 2019; Pokhrel et al., 2022; Sokolowska et al., 2014; Wiśniewski et al., 2024).

In the case of carrot juice, a study by Hwang et al. (2023) showed that a pressure of 200 MPa was not sufficient to significantly reduce *L. monocytogenes*, while at 500–600 MPa, complete inactivation of the bacteria was achieved. Moreover, bacteria recovery was observed during beverage storage after the application of 300–400 MPa, suggesting that the use of pressures below 500 MPa may not be sufficient to protect the product in the long term.

Cucumber juice also required pressures above 400 MPa to achieve adequate reduction of *L. monocytogenes*. A study by Bucur et al. (2020) showed that the application of 300 MPa for 8 min was not enough for effective inactivation, while increasing the pressure to 400 MPa allowed a 5–6 log CFU/ml reduction of this pathogen. In addition, storage tests showed that although no bacterial growth was observed during the first 72 h, the use of additional preservation methods (e.g., antimicrobial additives) could increase the shelf life of the product.

In the case of beet and carrot juice, a study by Nasilowska et al. (2018) indicates that *L. innocua* can survive at pressures of 300 MPa and even show the ability to recover during storage. Only the application of 400 MPa for 10 min allowed effective elimination (≥5 log CFU/ml reduction) of the bacteria, highlighting the need for higher pressures in vegetable beverages with higher pH.

4.1.3. Smoothies and other products

Fruity-vegetable smoothies, with their high viscosity arising from suspended dietary fibers and other bioactive components, can dampen the transmission of applied pressure - leading to slower and uneven distribution during HPP - while fibers and particulates create protective microenvironments that entrap bacterial cells in shielded “pockets,” and biopolymers interact with cell surfaces to stabilize membranes and increase mechanical resistance to compression (Daher et al., 2017; Sehrawat et al., 2021; Koutsoumanis et al., 2022; Zhao et al., 2023).

A study by Fernandez et al. (2020) showed that the application of 630 MPa pressure for 6 min allowed the elimination of *L. innocua* without adversely affecting the taste, color, or nutritional value of the product. Similar results were obtained for smoothies based on fresh fruits and vegetables in the study by Gonzalez-Tejedor et al. (2023) found that pressures above 400 MPa lead to > 6-log reduction of *L. monocytogenes* while preserving the sensory characteristics of the product.

In the case of UHT milk and plant-based beverages, the combination of HPP with natural preservatives such as nisin allowed for increased process efficiency. A study by Alcantara-Zayala et al. (2018) showed that nisin in combination with HPP (550 MPa for 2.5 min) provided a 3-log reduction of *L. monocytogenes*, which could be an alternative to standard pasteurization. In the case of coconut water, the use of HPP at 593 MPa for 3 min effectively eliminated *L. monocytogenes*, which shows that at sufficiently high pressure (≥593 MPa), even matrices with high pH and low protein content can be effectively preserved using pascalisation (Raghubeer et al., 2020).

4.2. Potential hazards of pascalisation

Although pascalization under the proper parameters, such as pressure, time, and temperature, effectively reduces the bacterial population, some strains may show the ability to survive under high-pressure conditions (Koutsoumanis et al., 2022) However, the effectiveness of this technology in the context of different types of beverages may be limited by the phenomenon of barotolerance of some *Listeria* sp. strains and the risk of the formation of viable but non-culturable (VBNC) cells by traditional culture methods. Survival of these microorganisms can lead to the re-growth of pathogens after the process, which is an additional risk in terms of the microbiological quality of beverages (Wiśniewski et al., 2023a). Moreover, sublethal HPP conditions may influence horizontal gene transfer (HGT) of antibiotic-resistance determinants (Wiśniewski et al., 2024).

HGT mechanisms – including transformation, conjugation, and transduction – have been identified as key pathways for the spread of antibiotic-resistance genes among *Listeria* sp. and other bacteria present in liquid foods (Thomas and Nielsen, 2005). Liquid matrices facilitate close cell–cell contacts and can thus amplify transfer frequencies. Previous studies on the effect of pascalization on resistance gene transfer levels have provided interesting preliminary indications suggesting the possibility of resistance gene uptake/transfer to *E. facealis* (although these were based on a limited number of experimental models) (Wiśniewski et al., 2024). Observations suggest that pascalisation can modulate the dynamics of antibiotic resistance gene transfer under controlled conditions. Future work should focus on quantitative HGT assays in realistic beverage models and on complete structural

characterization of plasmids to determine whether pascalisation poses a real threat to the spread of antibiotic resistance.

High pressures used in pascalisation lead to damage to genetic material (DNA breaks) and strongly induce the bacterial SOS response (a cellular mechanism induced by factors threatening DNA integrity, which promotes cell survival in stressful situations) (Lima-Noronha et al., 2022). The SOS response activates repair, recombination, and integron integrases genes, which facilitates the exchange of DNA fragments (Aertsen et al., 2004; Baharoglu et al., 2010). In addition, conjugative plasmid transfer itself triggers the SOS response in the recipient cell (Baharoglu et al., 2010), which derepresses integrons and enhances the transfer of resistance genes. In addition, HHP can alter the structure and permeability of bacterial cell membranes, increasing their susceptibility to uptake of plasmids and other genetic elements (Sehrawat et al., 2021).

With the growing number of reports describing antibiotic-resistant strains of *L. monocytogenes* isolated from food products – including minimally processed items such as fruit juices and fresh-cut fruit (Avila-Novoa et al., 2024; Kayode and Okoh, 2022, 2023; Wiśniewski et al., 2022) – there is an urgent need to monitor both the presence and behavior of resistance genes within food processing environments. Recent studies have detected multidrug-resistant *L. monocytogenes* strains in fresh produce and juice-containing fruit salads, showing resistance to commonly used antibiotics such as amoxicillin, erythromycin, and sulfamethoxazole (Kayode and Okoh, 2023). Strains recovered from these matrices have exhibited resistance to clinically important antibiotics, including penicillins, tetracyclines, and gentamicin. Current evidence indicates that many of these resistance determinants are associated with mobile genetic elements, facilitating their horizontal transfer across bacterial populations (Olaimat et al., 2018).

An additional challenge arises from the presence of silent antibiotic resistance genes in the *Listeria* sp. genome – genetic elements present in phenotypically susceptible strains that remain transcriptionally inactive under standard conditions (Wiśniewski et al., 2023b). Recent studies have shown that these silent genes can be activated under specific environmental stressors, such as physical treatments applied during food processing, including pascalisation (Wiśniewski et al., 2023b).

5. Methods to improve the effectiveness of pascalisation against *L. monocytogenes* and *L. innocua*

Pascalisation is an effective method for inactivating *L. monocytogenes* and *L. innocua* in beverages, but in some cases requires relatively high pressures (>400 MPa) and longer processing times. To increase process efficiency and reduce processing costs, methods to support pascalisation are increasingly being used. Among the methods noted in the literature are chemical additives such as ozone (Del Rosario García-Mateos et al., 2019), dimethyl decarbonate (DMDC) (Petrus et al., 2020a), ultraviolet (UV-C) radiation (Ali et al., 2020), and biopreservation (Alcantara-Zayala et al., 2018; Oner, 2020; Pokhrel et al., 2019; Yildiz et al., 2023), which can lower the required pressure, shorten the processing time, and prevent post-treatment bacterial growth.

One of the chemicals that promotes pascalisation is dimethyl decarbonate (DMDC), which exhibits strong bactericidal activity against various groups of microorganisms and is recognized by the European Food Safety Authority (EFSA) as safe for use in beverage preservation (EFSA Panel on Food additives and Nutrient Sources added to Food, 2015) . In studies conducted on apple juice, the combination of DMDC (116–250 mg/L) with HPP (100–600 MPa) was shown to achieve complete elimination of *L. monocytogenes* already at lower pressures. For example, the use of DMDC at a concentration of 116 mg/L with a pressure of 400 MPa shows similar efficacy to HPP alone at 600 MPa, allowing for the reduction in the intensity of the process and thus preserving the quality of the beverage (Petrus et al., 2020a). Organic acids such as acetic acid and citric acid also show similar effects, lowering the pH of beverages and increasing the sensitivity of bacteria to high pressure (Cheng et al., 2024; Pokhrel et al., 2022). In a study of fruit juices, it was shown that the use of acetic acid at pH 3.76 allowed effective elimination (≥5 log CFU/ml reduction) of *L. monocytogenes* at as low as 350 MPa, while at pH 4.50, a pressure of more than 490 MPa was required (Cheng et al., 2024).

Another effective method to promote pascalisation is the combination of HPP with UV-C radiation (Shahbaz et al., 2016). Ultraviolet with a wavelength of 254 nm causes damage to the DNA of bacteria, which inhibits their ability to replicate and repair damaged cellular structures, making them more susceptible to hydrostatic pressure. A study conducted on fruit juices showed that a combination of UV-C (0.82 J/cm^2) and HPP (500 MPa) led to the complete inactivation of *L. monocytogenes*, while the use of HPP without UV-C required a pressure of 600 MPa for the same effect (Shahbaz et al., 2016). The synergy of these methods allows for a significant reduction in technological costs and a reduced risk of surviving sublethally damaged bacterial cells that could regenerate during storage. However, it should be noted that the effectiveness of UV-C is limited in beverages with high turbidity, such as smoothies, because the radiation does not penetrate uniformly through the suspended particles (Ali et al., 2020).

A study by Del Rosario García-Mateos et al., (2019) presented the synergistic effects of ozone and HHP on microbial reduction in pitaya juice. Focus was given to the elimination of *L. innocua*, which is often used as a model organism for *L. monocytogenes*, a pathogen of food safety concern (Ramaswamy et al., 2007). The use of a combination of ozonation and HHP significantly reduced the count of *L. innocua*, indicating the effectiveness of this method in improving the microbiological stability of the juice. Ozone acts as a powerful oxidant that damages bacterial cell membranes, while high hydrostatic pressure leads to disruption of cell structure, which enhances the bactericidal effect. These results suggest that the combination of these technologies can be an effective alternative to traditional preservation methods, allowing the juice to extend its shelf life while maintaining its sensory quality and nutritional value.

Another promising strategy is biopreservation, or the use of natural antimicrobial substances such as bacteriocins (e.g., nisin) and competing microorganisms. Nisin, produced by the bacteria *Lactococcus lactis*, exhibits strong antimicrobial activity against *Listeria* sp. by forming pores in the bacterial cell membrane, leading to cytoplasm leakage and cell death (Alcantara-Zayala et al., 2018). In a study on UHT milk, it was shown that HPP (550 MPa/2.5 min) combined with nisin led to a 3-log reduction of *L. monocytogenes*, while HPP alone without the addition of a bioconservative showed lower efficacy. In addition, competitive microorganisms such as *L. lactis* Rif L+ (LUQ2) can reduce the growth of pathogens in dairy and fermented products, which may provide a natural alternative to chemical preservatives. In another study by Oner (2020) assessed HPP and thermosonication (TS) with nisin for green juice preservation. HPP at 600 MPa with 100 and 200 mg/L nisin achieved 5 and 7 log CFU/ml reductions of *L. innocua*, while TS at 60 °C with 100 mg/L nisin resulted in a 7-log reduction after 3 min. Despite significant color changes, pH and total soluble solids remained unaffected, confirming HPP and TS with nisin as viable pasteurization methods. Also, a study by Pokhrel et al. (2019) indicates that there is improved efficiency (and reduced pressure values with HPP) when using a combination of three technologies – HPP, nisin addition, and mild thermal treatment.

Another synergy between high pressures is the combination of pressure and moderate heat – high-pressure thermal processing (HPTP), typically employing 400–600 MPa at 50–75 °C (Houška et al., 2022). However, the literature does not report any HPTP studies on beverages to date, although this approach appears highly promising for that product range. Under these conditions, the adiabatic temperature rise (~3 °C per 100 MPa) amplifies pressure-induced denaturation of proteins and disruption of membranes, yielding rapid inactivation of vegetative *L. monocytogenes* and its surrogate *L. innocua*. For example,

treatment at 400 MPa and 40 °C in the presence of nisin achieved significantly greater log reductions than equivalent pressure-only or heat-only protocols (Aras et al., 2020; Knoerzer and Sevenich, 2025). Moreover, HPTP triggers germination of *Bacillus* and *Clostridium* spores, rendering them susceptible to subsequent thermal inactivation—effectively reaching commercial sterility levels (12-$\log_{10}$ reductions) while preserving sensory and nutritional quality far better than conventional retorting. Because HPTP employs lower overall thermal loads, it also maintains color, flavor, and vitamin retention superior to traditional thermal pasteurization (Knoerzer and Sevenich, 2025).

6. Future prospects

Although pascalisation is highly effective in eliminating *Listeria* sp. in beverages, especially at pressures above 400 MPa and in low pH environments, the method is not without limitations. Studies indicate that in some cases *L. monocytogenes* and *L. innocua* may show increased resistance to pascalization, and sublethally damaged cells may recover their ability to proliferate during storage. Particularly problematic are beverages with higher pH (e.g., vegetable juices, dairy, and vegetable drinks), in which there is no synergistic effect between high pressure and proton activity, combined with a complex matrix rich in proteins, fats, and polysaccharides, can protect bacterial cells and thus limit the effectiveness of high-pressure inactivation. In addition, the chemical composition of the beverage and the presence of antioxidants, proteins, or fiber can affect bacterial survival, which requires further research on optimizing processing conditions. The lack of clear guidelines for storing beverages after HPP makes it necessary to further determine the best parameters, such as temperature and storage time, to prevent the recovery of microorganisms. It is worth noting the aspect of combining pascalisation with other methods, which together affect the microbiological safety of beverages while reducing the pressure and time of the pascalisation. It is also necessary to observe the storage conditions of products treated with pascalisation to reduce the risk of the development of unfavorable microorganisms.

7. Conclusions

Pascalisation is an effective non-thermal preservation method for reducing contamination of beverages with *L. monocytogenes* and *L. innocua*, although its efficiency strongly depends on process parameters such as pressure level, dwell time, and temperature. While industrial processes commonly apply 600 MPa, some studies report significant bacterial inactivation at lower pressures. However, reducing pressure does not always ensure microbiological safety due to strain-specific barotolerance, the formation of viable but non-culturable cells undetectable by standard microbiological methods, and the risk of bacterial regrowth during storage. Pressures $<$300 MPa typically do not provide effective elimination ($\geq$5 log CFU/ml reduction) of *Listeria* sp. and lead to only a partial population reduction, which may allow the bacteria to regenerate during storage. Only pressures $>$400 MPa in most studies lead to more than 5-log reductions in *L. monocytogenes*, and even higher pressures are often necessary for *L. innocua*. Short treatment times ($\leq$1 min) are only effective at high pressures ($\geq$500 MPa), while longer times of up to 3–8 min are required at lower pressures, especially in pH-neutral products. Optimal process parameters should be selected individually for each beverage to minimize the risk of bacterial survival while maintaining product quality.

Combining pascalisation with supporting methods allows beverage manufacturers to optimize the process in terms of microbial efficiency, cost, and quality of the final product. Chemical additives such as DMDC and organic acids help lower the required pascalisation pressure, while UV-C increases the vulnerability of bacteria. Biopreservation, including the use of nisin and protective cultures, can further prevent the regrowth of *L. monocytogenes* after processing. The choice of the appropriate strategy depends on the specific beverage and technological requirements, but combining different HPP supporting methods is a promising direction for the development of safe and effective beverage preservation.

The possibility of activation of silent antibiotic resistance genes under pascalisation underscores the need for ongoing further research into the impact of pascalisation on the genetic stability of *Listeria* sp. and its ability to acquire and transmit resistance traits, particularly in the context of beverages. Ensuring microbiological safety without compromising product quality requires a multidisciplinary approach and further investigation into the combined effects of pascalisation and other non-thermal technologies.

CRediT authorship contribution statement

Patryk Wiśniewski: Writing – original draft, Visualization, Project administration, Methodology, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Anna Zadernowska:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Conceptualization.

Funding

This work was supported by the National Science Centre (Poland), grant number 2024/53/N/NZ9/00833 (PRELUDIUM-23). The APC was funded by the Minister of Science under "the Regional Initiative of Excellence Program".

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.fm.2025.104932.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

References

Abera, G., 2019. Review on high-pressure processing of foods. Cogent Food Agric. 5, 1568725. https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1568725.

Aertsen, A., Van Houdt, R., Vanoirbeek, K., Michiels, C.W., 2004. An SOS response induced by high pressure in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 186, 6133–6141. https://doi.org/10.1128/JB.186.18.6133-6141.2004.

Aganovic, K., Grauwet, T., Siemer, C., Toepfl, S., Heinz, V., Hendrickx, M., Van Loey, A., 2016. Headspace fingerprinting and sensory evaluation to discriminate between traditional and alternative pasteurization of watermelon juice. Eur. Food Res. Technol. 242, 787–803. https://doi.org/10.1007/s00217-015-2586-8.

Akwu, A.S., Allison, A., Adhikari, J., Henry, M., Inman, W., 2024. Enhancing maternal health: cost-effective alternatives in high-pressure processing of fruit products. Archives of Gastroenterology Research 5 (1), 21–41. https://doi.org/10.33696/Gastroenterology.5.052.

Alcantara-Zayala, A.E., Serment-Moreno, V., Velazquez-Lugo, K.I., Garcia-Almendarezi, B.E., Welti-Chanes, J., Regalado-Gonzalez, C., 2018. High-pressure processing (HPP) and in-situ nisin biosynthesis by *Lactococcus lactis*: a hurdle approach to improve *Listeria* spp. inactivation in bovine milk. Rev. Mex. Ing. Quim. 17, 269–277. https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2018v17n1/Alcantara.

Ali, N., Popovic, V., Koutchma, T., Warriner, K., Zhu, Y., 2020. Effect of thermal, high hydrostatic pressure, and ultraviolet-C processing on the microbial inactivation, vitamins, chlorophyll, antioxidants, enzyme activity, and color of wheatgrass juice. J. Food Process. Eng. 43. https://doi.org/10.1111/jfpe.13036.

Aras, S., Kabir, M.N., Chowdhury, S., Fouladkhah, A.C., 2020. Augmenting the pressure-based pasteurization of *Listeria monocytogenes* by synergism with nisin and mild heat. IJERPH 17, 563. https://doi.org/10.3390/ijerph17020563.

Avila-Novoa, M.G., Solís-Velazquez, O.A., Guerrero-Medina, P.J., Martínez-Chávez, L., Martínez-Gonzáles, N.E., Gutiérrez-Lomelí, M., 2024. *Listeria monocytogenes* in fruits

and vegetables: antimicrobial resistance, biofilm, and genomic insights. Antibiotics 13 (11), 1039. https://doi.org/10.3390/antibiotics13111039.
Baharoglu, Z., Bikard, D., Mazel, D., 2010. Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through integron activation. PLoS Genet. 6, e1001165. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001165.
Bainotti, M.B., Colás-Medà, P., Viñas, I., Neggazi, I., Alegre, I., 2025. Impact of intrinsic factors and storage temperature on *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* and *Listeria monocytogenes* survival in fruit juices. Int. J. Food Microbiol. 432, 111109. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111109.
Bambace, M.F., del Rosario Moreira, M., Sanchez-Moreno, C., De Ancos, B., 2021. Effects of combined application of high-pressure processing and active coatings on phenolic compounds and microbiological and physicochemical quality of apple cubes. J. Sci. Food Agric. 101, 4256–4265. https://doi.org/10.1002/jsfa.11065.
Bolumar, T., Orlien, V., Sikes, A., Aganovic, K., Bak, K.H., Guyon, C., Stübler, A., De Lamballerie, M., Hertel, C., Brüggemann, D.A., 2021. High-pressure processing of meat: molecular impacts and industrial applications. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 20, 332–368. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12670.
Bucur, F. ., Borda, D., Nicolau, A.I., Grigore-Gurgu, L., 2020. Assessment of *L. monocytogenes* cells' capacity to recover in cucumber juice after high pressure treatment. Annals Of The University Dunarea De Jos Of Galati, Fascicle Vi-Food Technology 44, 45–57. https://doi.org/10.35219/foodtechnology.2020.1.03.
Business Research Insights, 2025. High Pressure Processing (HPP) Juices Market Size, Share, Growth, and Industry Analysis, by Type (Mixed Juices, Fruit Juices, Vegetable Juices), by Application (Online Sales, Offline Sales), and Regional Insights and Forecast to 2033. No. BRI122199).
Caggia, C., Scifò, G.O., Restuccia, C., Randazzo, C.L., 2009. Growth of acid-adapted *Listeria monocytogenes* in orange juice and in minimally processed orange slices. Food Control 20 (1), 59–66. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.02.00.
Campus, M., 2010. High pressure processing of meat, meat products and seafood. Food Eng. Rev. 2, 256–273. https://doi.org/10.1007/s12393-010-9028-y.
Canadian Food Inspection Agency, n.d, Novel Food Information - High Pressure Processing (HPP)-treated Fruit and Vegetable-based Juices.
Cheng, R.M., Usaga, J., Worobo, R.W., 2024. Foodborne pathogen inactivation in fruit juices utilizing commercial scale high-pressure processing: effects of acidulants and pH. Food Sci. Technol. Int. 30, 592–600. https://doi.org/10.1177/10820132231219525.
Commission Regulation (EU), 2024. 2024/2895 of 20 November 2024 Amending Regulation (EC) No 2073/2005 as Regards *Listeria* monocytogenes.
Daher, D., Le Gourrierec, S., Pérez-Lamela, C., 2017. Effect of high pressure processing on the microbial inactivation in fruit preparations and other vegetable based beverages. Agriculture 7 (9), 72. https://doi.org/10.3390/agriculture7090072.
Del Rosario García-Mateos, M., Quiroz-González, B., Corrales-García, J., Ybarra-Moncada, MaC., Leyva-Ruelas, G., 2019. Ozone-high hydrostatic pressure synergy for the stabilization of refrigerated pitaya (Stenocereus pruinosus) juice. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 56, 102187. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102187.
Duru, I.C., Bucur, F.I., Andreevskaya, M., Nikparvar, B., Ylinen, A., Grigore-Gurgu, L., Rode, T.M., Crauwels, P., Laine, P., Paulin, L., Løvdal, T., Riedel, C.U., Bar, N., Borda, D., Nicolau, A.I., Auvinen, P., 2021. High-pressure processing-induced transcriptome response during recovery of *Listeria* monocytogenes. BMC Genom. 22, 117. https://doi.org/10.1186/s12864-021-07407-6.
EFSA Panel on Food additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), 2015. Scientific opinion on the re-evaluation of dimethyl dicarbonate (DMDC, E 242) as a food additive. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4319.
European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2024. Listeriosis - Annual Epidemiological Report for 2022. Stockholm: ECDC. Available at: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/LIST_AER_2022_Report.pdf (Access: April 4, 2025.).
European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2024. The European Union one health 2023 zoonoses report. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.9106.
Fernandez, M.V., Denoya, G.I., Aguero, M.V., Vaudagna, S.R., Jagus, R.J., 2020. Quality preservation and safety ensurement of a vegetable smoothie by high-pressure processing. J. Food Process. Preserv. 44. https://doi.org/10.1111/jfpp.14326.
Ferreira, M., Almeida, A., Delgadillo, I., Saraiva, J., Cunha, Â., 2016. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* to high pressure processing: a review. Food Rev. Int. 32, 377–399. https://doi.org/10.1080/87559129.2015.1094816.
Friedly, E.C., Crandall, P.G., Ricke, S., O'Bryan, C.A., Martin, E.M., Boyd, L.M., 2008. Identification of *Listeria innocua* surrogates for *Listeria monocytogenes* in hamburger patties. J. Food Sci. 73. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00719.x.
Gomes, B.A.F., Alexandre, A.C.S., De Andrade, G.A.V., Zanzini, A.P., De Barros, H.E.A., Ferraz E Silva, L.M.D.S., Costa, P.A., Boas, E.V.D.B.V., 2023. Recent advances in processing and preservation of minimally processed fruits and vegetables: a review – part 2: physical methods and global market outlook. Food Chemistry Advances 2, 100304. https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100304.
Gonzalez-Tejedor, G., Garre, A., Egea, J.A., Aznar, A., Artes-Hernandez, F., Fernandez, P. S., 2023. Application of high hydrostatic pressure in fresh purple smoothie: microbial inactivation kinetic modelling and qualitative studies. Food Sci. Technol. Int. 29, 372–382. https://doi.org/10.1177/10820132221095607.
González-Tejedor, G., Garre, A., Egea, J.A., Aznar, A., Artés-Hernández, F., Fernández, P. S., 2023. Application of high hydrostatic pressure in fresh purple smoothie: microbial inactivation kinetic modelling and qualitative studies. Food Sci. Technol. Int. 29, 372–382. https://doi.org/10.1177/10820132221095607.
Gouvea, F.S., Padilla-Zakour I., O., Worobo, R.W., Xavier, B.M., Walter, E.H., Rosenthal, A., 2020. Effect of high-pressure processing on bacterial inactivation in acai juices with varying pH and soluble solids content. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 66. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102490.
Hiperbaric, 2022. Hiperbaric high pressure processing: HPP innovation week 2022 (Sustainability). In: https://www.hiperbaric.com/en/high-pressure-processing-a-sustainable-technology/.
Houška, M., Silva, F.V.M., Evelyn, Buckow, R., Terefe, N.S., Tonello, C., 2022. High pressure processing applications in plant foods. Foods 11, 223. https://doi.org/10.3390/foods11020223.
Hua, Z., Zhu, M., 2024. Comprehensive strategies for controlling *Listeria monocytogenes* biofilms on food-contact surfaces. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 23, e13348. https://doi.org/10.1111/1541-4337.13348.
Hwang, C.-C., Lin, C.-S., Hsiao, Y.-T., Huang, Y.-L., Yen, F.-L., Lee, Y.-C., Tsai, Y.-H., 2023. Inactivation kinetics of foodborne pathogens in carrot juice by high-pressure processing. Biology 12. https://doi.org/10.3390/biology12111383.
Jermann, C., Koutchma, T., Margas, E., Leadley, C., Ros-Polski, V., 2015. Mapping trends in novel and emerging food processing technologies around the world. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 31, 14–27. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.06.007.
Kamat, A.S., Nair, P.M., 1996. Identification of as a biological indicator for inactivation of by some meat processing treatments. LWT - Food Sci. Technol. (Lebensmittel-Wissenschaft -Technol.) 29, 714–720. https://doi.org/10.1006/fstl.1996.0111.
Kaur, A., Yemmireddy, V., 2023. Effect of different pre-growth temperatures on the survival kinetics of Salmonella enterica and *Listeria* monocytogenes in fresh-cut salad during refrigerated storage. Foods 12, 4287. https://doi.org/10.3390/foods12234287.
Kayode, A.J., Okoh, A.I., 2022. Incidence and genetic diversity of multi-drug resistant *Listeria monocytogenes* isolates recovered from fruits and vegetables in the Eastern Cape Province, South Africa. Int. J. Food Microbiol. 363, 109513. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109513.
Kayode, A.J., Okoh, A.I., 2023. Antimicrobial-resistant *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: implications for food safety and risk assessment. Foods 12 (6), 1346. https://doi.org/10.3390/foods12061346.
Kieling, D.D., Barbosa-Cánovas, G.V., Prudencio, S.H., 2019. Effects of high pressure processing on the physicochemical and microbiological parameters, bioactive compounds, and antioxidant activity of a lemongrass-lime mixed beverage. J. Food Sci. Technol. 56, 409–419. https://doi.org/10.1007/s13197-018-3502-6.
Knoerzer, K., Sevenich, R., 2025. From concept to commercialization: unlocking the potential of high-pressure thermal processing. Food Eng. Rev. https://doi.org/10.1007/s12393-025-09414-9.
EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ Panel), Koutsoumanis, K., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Herman, L., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Castle, L., Crotta, M., Grob, K., Milana, M.R., Petersen, A., Roig Sagués, A.X., Vinagre Silva, F., Barthélémy, E., Christodoulidou, A., Messens, W., Allende, A., 2022. The efficacy and safety of high-pressure processing of food. EFS2 20. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7128.
Lee, P.Y., Leong, S.Y., Oey, I., 2024. Prospects of pulsed electric fields technology in food preservation and processing applications from sensory and consumer perspectives. Int. J. Food Sci. Technol. 59, 6925–6943. https://doi.org/10.1111/ijfs.17515.
Leong, S.Y., Duque, S.M.M., Conde, L.A., Khrisanapant, P., Oey, I., 2024. Addressing the opportunities of non-thermal food processing technologies in the ASEAN region context. Int. J. Food Sci. Technol. 59, 7739–7753. https://doi.org/10.1111/ijfs.17203.
Lima-Noronha, M.A., Fonseca, D.L.H., Oliveira, R.S., Freitas, R.R., Park, J.H., Galhardo, R.S., 2022. Sending out an SOS - the bacterial DNA damage response. Genet. Mol. Biol. 45, e20220107. https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2022-0107.
Lorenzo, J.M., Munekata, P.E., Dominguez, R., Pateiro, M., Saraiva, J.A., Franco, D., 2018. Main groups of microorganisms of relevance for food safety and stability. In: Innovative Technologies for Food Preservation. Elsevier, pp. 53–107. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811031-7.00003-0.
Markwide Research Report, 2025. Global non-thermal pasteurization market size by techniques (high pressure processing (HPP), pulse electric field (PEF)). By Application (Food, Beverages), by Food Form (Solid Form, Liquid Form), by Geographic Scope and Forecast. No. 395700).
Nabi, B.G., Mukhtar, K., Arshad, R.N., Radicetti, E., Tedeschi, P., Shahbaz, M.U., Walayat, N., Nawaz, A., Inam-Ur-Raheem, M., Aadil, R.M., 2021. High-pressure processing for sustainable food supply. Sustainability 13. https://doi.org/10.3390/su132413908.
Nasilowska, J., Sokolowska, B., Fonberg-Broczek, M., 2018. Long-term storage of vegetable juices treated by high hydrostatic pressure: assurance of the microbial safety. BioMed Res. Int. https://doi.org/10.1155/2018/7389381, 2018.
Nasilowska, J., Sokolowska, B., Fonberg-Broezek, 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.
Nesterova, E., Morozova, P., Gladkikh, M., Kazemzadeh, S., Syromyatnikov, M., 2024. Molecular methods for detecting microorganisms in beverages. Beverages 10, 46. https://doi.org/10.3390/beverages10020046.
Olaimat, A.N., Al-Holy, M.A., Shahbaz, H.M., Al-Nabulsi, A.A., Abu Ghoush, M.H., Osaili, T.M., Ayyash, M.M., Holley, R.A., 2018. Emergence of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes* isolated from food products: a comprehensive review. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 17, 1277–1292. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12387.
Oner, M.E., 2020. The effect of high-pressure processing or thermosonication in combination with nisin on microbial inactivation and quality of green juice. J. Food Process. Preserv. 44. https://doi.org/10.1111/jfpp.14830.

Ozaybi, N., 2024. High-pressure processing of milk and dairy products: latest update. Processes 12, 2073. https://doi.org/10.3390/pr12102073.
Page, M.J., McKenzie, J.E., Bossuyt, P.M., Boutron, I., Hoffmann, T.C., Mulrow, C.D., Shamseer, L., Tetzlaff, J.M., Akl, E.A., Brennan, S.E., Chou, R., Glanville, J., Grimshaw, J.M., Hróbjartsson, A., Lalu, M.M., Li, T., Loder, E.W., Mayo-Wilson, E., McDonald, S., McGuinness, L.A., Stewart, L.A., Thomas, J., Tricco, A.C., Welch, V.A., Whiting, P., Moher, D., 2021. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. BMJ n71. https://doi.org/10.1136/bmj.n71.
Pérez-Lamela, C., Franco, I., Falqué, E., 2021. Impact of high-pressure processing on antioxidant activity during storage of fruits and fruit products: a review. Molecules 26, 5265. https://doi.org/10.3390/molecules26175265.
Petrus, R., Churey, J., Worobo, R., 2019. Searching for high pressure processing parameters for Escherichia coli O157:H7, Salmonella enterica and *Listeria* monocytogenes reduction in Concord grape juice. Br. Food J. 122, 170–180. https://doi.org/10.1108/BFJ-06-2019-0446.
Petrus, R., Churey, J., Worobo, R., 2020. Searching for high pressure processing parameters for Escherichia coli O157:H7, Salmonella enterica and *Listeria* monocytogenes reduction in Concord grape juice. Br. Food J. 122, 170–180. https://doi.org/10.1108/BFJ-06-2019-0446.
Petrus, R.R., Churey, J.J., Humiston, G.A., Cheng, R.M., Worobo, R.W., 2020a. The combined effect of high pressure processing and dimethyl dicarbonate to inactivate foodborne pathogens in apple juice. Braz. J. Microbiol. 51, 779–785. https://doi.org/10.1007/s42770-019-00145-8.
Petrus, R.R., Churey, J.J., Worobo, R.W., 2020b. Challenging a range of high pressure processing parameters to inactivate pathogens in orange juice. High Press. Res. 40, 537–542. https://doi.org/10.1080/08957959.2020.1830081.
Pinto, C.A., Moreira, S.A., Fidalgo, L.G., Inácio, R.S., Barba, F.J., Saraiva, J.A., 2020. Effects of high-pressure processing on fungi spores: factors affecting spore germination and inactivation and impact on ultrastructure. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 19, 553–573. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12534.
Pokhrel, P.R., Toniazzo, T., Boulet, C., Oner, M.E., Sablani, S.S., Tang, J., Barbosa-Cánovas, G.V., 2019. Inactivation of *Listeria* innocua and Escherichia coli in carrot juice by combining high pressure processing, nisin, and mild thermal treatments. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 54, 93–102. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.03.007.
Pokhrel, P.R., Boulet, C., Yildiz, S., Shyam, S., Juming, T., Barbosa-Canovas, G.V., 2022. Effect of high hydrostatic pressure on microbial inactivation and quality changes in carrot-orange juice blends at varying pH. Lwt-Food Science And Technology 159. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113219.
Possas, A., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., García-Gimeno, R.M., 2017. Modelling the inactivation of *Listeria* monocytogenes by high hydrostatic pressure processing in foods: a review. Trends Food Sci. Technol. 70, 45–55. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.006.
Quereda, J.J., Morón-García, A., Palacios-Gorba, C., Dessaux, C., García-del Portillo, F., Pucciarelli, M.G., Ortega, A.D., 2021. Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes* : a trip from environmental to medical microbiology. Virulence 12, 2509–2545. https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1975526.
Quiroz-González, B., Rodríguez-Martínez, V., García-Mateos, M.D.R., Torres, J.A., Welti-Chanes, J., 2018. High hydrostatic pressure inactivation and recovery study of *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* in Pitaya (*Stenocereus pruinosus*) juice. FSET 50, 169–173. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.10.003.
Raghubeer V., E., Ngoc Phan, B., Onuoha, E., Diggins, S., Aguilar, V., Swanson, S., Lee, A., 2020. The use of high-pressure processing (HPP) to improve the safety and quality of raw coconut (Cocos nucifera L) water. Int. J. Food Microbiol. 331. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108697.
Rahman, S. (Ed.), 2020. Handbook of Food Preservation, third ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL. https://doi.org/10.1201/9780429091483.
Ramaswamy, V., Cresence, V.M., Rejitha, J.S., Lekshmi, M.U., Dharsana, K.S., Prasad, S. P., Vijila, H.M., 2007. *Listeria* — review of epidemiology and pathogenesis. J. Microbiol. Immunol Infect. 40, 4-13.
Riekkinen, K., Martikainen, K., Korhonen, J., 2023. Effectiveness of high-pressure processing treatment for inactivation of *Listeria* monocytogenes in cold-smoked and warm-smoked rainbow trout. Appl. Sci. 13, 3735. https://doi.org/10.3390/app13063735.
Rodrigues Petrus, R., Joseph Churey, J., William Worobo, R., 2020. High pressure processing of Apple juice: the most effective parameters to inactivate pathogens of reference. Br. Food J. 122, 3969–3979. https://doi.org/10.1108/BFJ-03-2020-0178.
Rosenthal, A., Pokhrel, P.R., Da Rocha Ferreira, E.H., Tiburski, J.H., Barbosa-Cánovas, G. V., Welti-Chanes, J., 2018. High pressure processing of fruit products. In: Rosenthal, A., Deliza, R., Welti-Chanes, J., Barbosa-Cánovas, G.V. (Eds.), Fruit Preservation, Food Engineering Series. Springer, New York, New York, NY, pp. 351–398. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3311-2_13.
Scolari, G., Zacconi, C., Busconi, M., Lambri, M., 2015. Effect of the combined treatments of high hydrostatic pressure and temperature on Zygosaccharomyces bailii and *Listeria* monocytogenes in smoothies. Food Control 47, 166–174. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.006.
Sehrawat, R., Kaur, B.P., Nema, P.K., Tewari, S., Kumar, L., 2021. Microbial inactivation by high pressure processing: principle, mechanism and factors responsible. Food Sci. Biotechnol. 30, 19–35. https://doi.org/10.1007/s10068-020-00831-6.
Shahbaz, H.M., Yoo, S., Seo, B., Ghafoor, K., Kim, J.U., Lee, D.-U., Park, J., 2016. Combination of TiO2-UV photocatalysis and high hydrostatic pressure to inactivate bacterial pathogens and yeast in commercial Apple juice. Food Bioprocess Technol. 9, 182–190. https://doi.org/10.1007/s11947-015-1614-9.
Shankar, R., 2014. High pressure processing- changes in quality characteristic of various food material processed under high pressure technology. International Journal of Innovation Science and Research 3, 168–186.
Sokolowska, B., Skapska, 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 Press. Res. 34, 147–155. https://doi.org/10.1080/08957959.2013.877458.
Szczepańska, J., 2017. Zastosowanie wysokich ciśnień do utrwalania soków NFC. Fermentation. Fruits And Vegetable Industry 1, 50–54. https://doi.org/10.15199/64.2017.11-12.3.
Tasara, T., Stephan, R., 2006. Cold stress tolerance of *listeria* monocytogenes: a review of molecular adaptive mechanisms and food safety implications. J. Food Protect. 69, 1473–1484. https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.6.1473.
Teixeira, J.S., Maier, M.B., Miller, P., Gänzle, M.G., McMullen, L.M., 2016. The effect of growth temperature, process temperature, and sodium chloride on the high-pressure inactivation of *Listeria* monocytogenes on ham. Eur. Food Res. Technol. 242, 2021–2029. https://doi.org/10.1007/s00217-016-2700-6.
Thomas, C.M., Nielsen, K.M., 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. Nat. Rev. Microbiol. 3, 711–721. https://doi.org/10.1038/nrmicro1234.
Usaga, J., Acosta, O., Churey, J.J., Padilla-Zakour, O.I., Worobo, R.W., 2021. Evaluation of high pressure processing (HPP) inactivation of Escherichia coli O157:H7, Salmonella enterica, and *Listeria* monocytogenes in acid and acidified juices and beverages. Int. J. Food Microbiol. 339. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.109034.
Virtue Market Research, 2024. Europe High Pressure Processing Equipment Market Research Report – Segmentation by Pressure Range (Low-Pressure Systems (100 - 300 Mpa), Mid-pressure Systems (300 - 600 Mpa), ultra-high-pressure Systems (600 + Mpa)); by Application (Beverages, Meat, Poultry, and Seafood, Fruits, Vegetables, and Ready-to-Eat (RTE) Meals); by Vessel Orientation (Horizontal Systems, Vertical Systems); and Region; - Size, Share, Growth Analysis | Forecast (2024– 2030). VMR16658.
Wachowicz, J., 2019. Utrwalanie soków wysokiej jakości z wykorzystaniem wysokich ciśnień. FOOD INDUSTRY 1, 32–37. https://doi.org/10.15199/65.2019.3.5.
Wiśniewski, P., Zakrzewski, A.J., Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., 2022. Antimicrobial resistance and virulence characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environments. Pathogens 11 (10), 1099. https://doi.org/10.3390/pathogens11101099.
Wiśniewski, P., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., 2023a. Impact of high-pressure processing (HPP) on *listeria* monocytogenes—An overview of challenges and responses. Foods 13, 14. https://doi.org/10.3390/foods13010014.
Wiśniewski, P., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., 2023b. High-pressure processing—Impacts on the virulence and antibiotic resistance of *Listeria* monocytogenes isolated from food and food processing environments. Foods 12, 3899. https://doi.org/10.3390/foods12213899.
Wiśniewski, P., Chajecka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., 2024. High-pressure processing influences antibiotic resistance gene transfer in *Listeria* monocytogenes isolated from food and processing environments. Int. J. Mol. Sci. 25. https://doi.org/10.3390/ijms252312964.
Woldemariam, H.W., Emire, S.A., 2019. High pressure processing of foods for microbial and mycotoxins control: current trends and future prospects. Cogent Food Agric. 5 (1). https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1622184.
Yildiz, S., Shin, G.Y., Franco, B.G., Tang, J., Sablani, S., Barbosa-Cánovas, G.V., 2023. Equivalent processing for pasteurization of a pineapple juice–coconut milk blend by selected nonthermal technologies. J. Food Sci. 88, 403–416. https://doi.org/10.1111/1750-3841.16403.
Zacconi, C., Giosue, S., Marudelli, M., Scolari, G., 2015. Microbiological quality and safety of smoothies treated in different pressure-temperature domains: effects on indigenous fruit microbiota and *Listeria* monocytogenes and their survival during storage. Eur. Food Res. Technol. 241, 317–328. https://doi.org/10.1007/s00217-015-2460-8.
Zhao, S., Pan, Z., Azarakhsh, N., Ramaswamy, H.S., Duan, H., Wang, C., 2023. Effects of high-pressure processing on the physicochemical and adsorption properties, structural characteristics, and dietary fiber content of kelp (*Laminaria japonica*). Curr. Res. Food Sci. 8, 100671. https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100671.
Zhu, Q., Gooneratne, R., Hussain, M., 2017. *Listeria* monocytogenes in fresh produce: outbreaks, prevalence and contamination levels. Foods 6, 21. https://doi.org/10.3390/foods6030021.
Ziegler, M., Rüegg, S., Stephan, R., Guldimann, C., 2018. Growth potential of *Listeria monocytogenes* in six different RTE fruit products: impact of food matrix, storage temperature and shelf life. Italian Journal of Food Safety 7 (3). https://doi.org/10.4081/ijfs.2018.7581.

Olsztyn, dn. 08.06.2026 r.
(miejscowość, data)

mgr inż. Patryk Wiśniewski
(imię i nazwisko kandydata)
Technologia żywności i żywienia
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE
autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: *Application of pascalisation in the control of Listeria sp. in beverages – Effectiveness, limitations, and future prospects* (Wiśniewski, P., Zadernowska, A. (2026). Application of pascalisation in the control of Listeria sp. in beverages – Effectiveness, limitations, and future prospects. Food Microbiology, 134, 104932. https://doi.org/10.1016/j.fm.2025.104932) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, przeprowadzeniu analiz literatury, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich dyskusji na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny).

Wiśniewski Patryk
(podpis kandydata)

Olszty, dn. 08.06.2026 r.
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Anna Zadernowska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem *Application of pascalisation in the control of Listeria sp. in beverages – Effectiveness, limitations, and future prospects* (Wiśniewski, P., Zadernowska, A. (2026). Application of pascalisation in the control of Listeria sp. in beverages – Effectiveness, limitations, and future prospects. Food Microbiology, 134, 104932. https://doi.org/10.1016/j.fm.2025.104932) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: udziale w opracowaniu metodologii badań, korekcie manuskryptu i opiece merytorycznej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Patryka Wiśniewskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Patryka Wiśniewskiego polegający na: udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, przeprowadzeniu analiz literatury, analizie uzyskanych wyników i ich interpretacji, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu tj. zebraniu i przygotowaniu przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich dyskusji na tle danych literaturowych, sformułowaniu wniosków, korekty artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem wydawnictwa (autor korespondencyjny).

Anna Zadernowska
.....
podpis