



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

w Warszawie

Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka

Mgr inż. Mateusz Gemba

**Prognostyczny model zdolności tworzenia
biofilmu przez bakterie patogenne
wyizolowane z mleka kobiecego**

Predictive model of biofilm formation capacity of pathogenic
bacteria isolated from breast milk

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem:

Prof. dr hab. Danuty Kołożyn-Krajewskiej

Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności

Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Promotor pomocniczy:

Dr inż. Elżbieta Rosiak

Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności

Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa 2025

*Pragnę złożyć głębokie wyrazy wdzięczności
Pani Profesor dr hab. Danucie Kołożyn-Krajewskiej
za objęcie promotorstwa mojej pracy doktorskiej,
nieocenione wsparcie merytoryczne, cenne wskazówki
oraz życzliwość i wyrozumiałość,
które towarzyszyły mi na każdym etapie realizacji rozprawy.*

*Składam serdeczne podziękowania promotor pomocniczej
Pani dr inż. Elżbiecie Rosiak
za zaangażowanie, motywację do działania
oraz nieustanne wsparcie.*

*Dziękuję wszystkim Pracownikom Zakładu Higieny i Zarządzania Jakością Żywności
SGGW w Warszawie za pomoc,
inspirującą atmosferę oraz życzliwość,
którą odczuwałem na każdym kroku, podczas realizacji badań.*

*Wszystkim Państwu dziękuję za towarzyszenie mi w tej naukowej drodze – dzięki Wam
była ona bogatsza i możliwa do przebycia.*

Oświadczenie promotora pracy

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia tej pracy w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 18.06.2025

Czytelny podpis promotora Samuela Jędrzejka

Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz. U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z nadaniem dyplomu lub uzyskaniem tytułu zawodowego.

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

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data 18.06.2025

Czytelny podpis autora rozprawy Mateusz Gembor

Streszczenie

Prognostyczny model zdolności tworzenia biofilmu przez bakterie patogenne wyizolowane z mleka kobiecego

Mleko kobiece może zawierać mikroorganizmy pożyteczne, jak również mikroorganizmy potencjalnie patogenne. Z mleka kobiecego izolowano bakterie patogenne, np. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Bacillus* spp. Bakterie te, mogą być zagrożeniem dla noworodków oraz mogą tworzyć biofilm na powierzchniach. Biofilm bakteryjny może oderwać się od przylegającej powierzchni. Etap ten stanowi istotne zagrożenie mikrobiologiczne, ponieważ uwolnione z biofilmu bakterie mogą przyczynić się do wystąpienia zakażenia. Konieczne jest zatem, poszukiwanie rozwiązań, które mogą stanowić przydatne narzędzie w ocenie i zarządzaniu ryzykiem zakażeń noworodków w placówkach odpowiedzialnych za jakość mikrobiologiczną mleka kobiecego.

Celem pracy była ocena zdolności tworzenia biofilmu na różnych powierzchniach, przez szczep *Cronobacter sakazakii* ATCC 25944 i przez wyizolowane z mleka kobiecego bakterie patogenne oraz konstrukcja matematycznego modelu prognostycznego, opisującego tworzenie biofilmu na powierzchniach mających kontakt z mlekiem kobiecym. Niniejsza praca doktorska została przygotowana na podstawie trzech, spójnych tematycznie publikacji naukowych.

Zakres pracy obejmował przegląd literatury w zakresie oceny występowania zagrożenia powodowanego przez bakterie *Cronobacter* spp., ocenę jakości mikrobiologicznej mleka kobiecego w kierunku *Cronobacter* spp. i ocenę zdolności tworzenia biofilmu przez izolaty, na modelowej powierzchni polistyrenu.

W ramach badań przeprowadzono również modelowe badania oceny zdolności tworzenia biofilmu na powierzchniach medycznego polichlorku winylu, polipropylenu i stali nierdzewnej przez bakterie wyizolowane z mleka kobiecego: *E. cloacae* i szczep wzorcowy *Cronobacter sakazakii* ATCC 25944. Na podstawie otrzymanych wyników zaprojektowano matematyczne prognostyczne modele zdolności tworzenia biofilmu. Modele te będą przydatnym narzędziem w ocenie i zarządzaniu ryzykiem powstawania biofilmu, w placówkach odpowiedzialnych za jakość mikrobiologiczną mleka kobiecego.

Słowa kluczowe: mleko kobiece, *Cronobacter sakazakii* ATCC 25944, *Enterobacter cloacae*, polistyren, medyczny polichlorek winylu, polipropylen, stal nierdzewna, mikrobiologia prognostyczna

Abstract

Predictive model of biofilm formation capacity by pathogenic bacteria isolated from breast milk

Human breast milk may contain both beneficial and potentially pathogenic microorganisms. Pathogenic bacteria such as *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., and *Bacillus* spp. have been isolated from breast milk. These microorganisms can pose a threat to neonates and have the ability to form biofilms on various surfaces. Bacterial biofilm detachment from contact surfaces represents a significant microbiological hazard, as the released bacteria may lead to infections. Therefore, the development of tools to assess and manage the risk of neonatal infections is essential for institutions responsible for the microbiological quality of breast milk.

The aim of this study was to evaluate the biofilm-forming ability of *Cronobacter sakazakii* ATCC 25944 and other pathogenic bacteria isolated from human milk on various surfaces, and to construct a mathematical predictive model describing biofilm development on materials that come into contact with breast milk. This doctoral dissertation is based on three thematically related scientific publications.

The scope of the study included a literature review on the occurrence and risks associated with *Cronobacter* spp., microbiological quality assessment of human milk in terms of *Cronobacter* spp. presence, and evaluation of biofilm formation capacity of the isolates on polystyrene model surfaces.

Experimental work also involved assessing biofilm formation on medical-grade polyvinyl chloride, polypropylene, and stainless steel surfaces by *Enterobacter cloacae* isolates and *C. sakazakii* ATCC 25944. Based on the results, mathematical predictive models of biofilm formation were developed. These models may serve as valuable tools for risk assessment and management of biofilm-related contamination in facilities ensuring the microbiological safety of human breast milk.

Key words: human breast milk, *Cronobacter sakazakii* ATCC 25944, *Enterobacter cloacae*, polystyrene, medical-grade polyvinyl chloride, polypropylene, stainless steel, predictive microbiology

Spis treści

1. Uzasadnienie wyboru tematu badawczego	11
2. Cel pracy, hipotezy badawcze i zakres pracy	14
2.1 Cel pracy	14
2.2 Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe	14
2.3 Hipotezy badawcze	15
2.4 Zakres badań	16
3. Materiał i metodyka badań	17
3.1 Materiał badawczy	17
3.2 Metody badawcze	18
3.2.1 Zadanie badawcze nr 1 - przegląd literatury w zakresie występowania bakterii patogennych w mleku kobiecym (publikacja P1)	18
3.2.2 Zadanie badawcze nr 2 - ocena jakości mikrobiologicznej mleka kobiecego w kierunku <i>Cronobacter</i> spp. i badania modelowe oceny zdolności tworzenia biofilmu przez izolaty bakteryjne mleka kobiecego na powierzchni polistyrenu w wybranych parametrach czasowych i temperaturowych (publikacja P2).	18
3.2.3 Zadanie badawcze nr 3 - ocena zdolności tworzenia biofilmu na trzech badanych powierzchniach (PVC, stal nierdzewna, polipropylen) przez bakterie patogene wyizolowane z mleka kobiecego: <i>E. cloacea</i> oraz szczep wzorcowy <i>C. sakazakii</i> ATCC 29544 i konstrukcja matematycznego prognostycznego modelu tworzenia biofilmu (publikacja P3).	22
4. Wyniki badań	24
4.1 Zadanie badawcze nr 1 - przegląd literatury w zakresie występowania bakterii patogennych w mleku kobiecym (publikacja P1)	24
4.2 Zadanie badawcze nr 2 - ocena jakości mikrobiologicznej mleka kobiecego w kierunku <i>Cronobacter</i> spp. i badania modelowe oceny zdolności tworzenia biofilmu przez izolaty bakteryjne mleka kobiecego na powierzchni polistyrenu w wybranych parametrach czasowych, temperaturowych i gęstości inokulum (publikacja P2).	27

4.3 Zadanie badawcze nr 3 - ocena zdolności tworzenia biofilmu na trzech badanych powierzchniach (PVC, stal nierdzewna, polipropylen) przez bakterie patogenne wyizolowane z mleka kobiecego: <i>E. cloacea</i> i szczep wzorcowy <i>C. sakazakii</i> ATCC 29544 oraz konstrukcja matematycznego prognostycznego modelu tworzenia biofilmu (publikacja P3)	32
5. Dyskusja wyników	37
6. Stwierdzenia i wnioski	45
7. Spis piśmiennictwa	47
8. Publikacje stanowiące rozprawę doktorską	54

1. Uzasadnienie wyboru tematu badawczego

Jeszcze w XX wieku uważano, że mleko kobiece jest jałowe. W rzeczywistości mleko kobiece może zawierać mikroorganizmy pożyteczne, jak również mikroorganizmy potencjalnie patogenne. Z mleka kobiecego wyizolowano bakterie: *Lactobacillus* (obecnie *Lactocaseibacillus*) *rhamnosus*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus* (obecnie *Lactiplantibacillus*) *plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum* (obecnie *Limosilactobacillus*), *Streptococcus parasonguis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus perarisi*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus aureus*, *Bifidobacterium bifidum*. Bakterie te uznawane są za naturalną mikroflorę mleka kobiecego. Wśród wymiononych bakterii znajdują się także szczepy patogenne, jednakże nie stanowią one zagrożenia dla niemowląt urodzonych o czasie i z prawidłowo wykształconym układem immunologicznym (Malinowska-Pańczyk, 2017).

Obecność bakterii patogennych w mleku kobiecym może stanowić poważny problem przy pobieraniu i utrwalaniu mleka w bankach mleka. Z mleka kobiecego izolowano bakterie patogenne, np. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Bacillus* spp. (Strom i wsp., 2022). W literaturze naukowej opisywane są przypadki zakażeń noworodków patogenami, w wyniku karmienia mlekiem pozyskanym z regionalnych banków mleka kobiecego. Opisane zakażenia były wywołane m.in. następującymi patogenami: *Cronobacter sakazakii*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*. Bakterie te mogą być przyczyną sepsy, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i martwiczego zapalenia jelit. Na przykład we wrześniu 2021 r. w USA u 14-dniowego noworodka doszło do śmiertelnego zapalenia opon mózgowych, w wyniku zakażenia *C. sakazakii*. Bakterię wyizolowano z mieszanki mlekozastępczej, odciągniętego mleka matki oraz pojemnika na wodę. Kolejny przypadek miał miejsce, w lutym 2022 r. w USA. Sepsę i zapalenie opon mózgowych stwierdzono u 20-dniowego noworodka. Chorobę, która zakończyła się śmiercią noworodka, wywołało zakażenie *C. sakazakii*. Bakterię wyizolowano z odciągniętego mleka matki, rurki do enteralnego żywienia niemowląt i części laktatora (Haston i wsp., 2023).

Bardzo częstym problemem zgłaszanym przez banki mleka kobiecego jest zanieczyszczenie mleka bakteriami *B. cereus*. *B. cereus* jest bakterią przetrwalnikującą i Gram-dodatnią. Mleko w banku jest pasteryzowane (62,5 °C; 30 minut), ale proces pasteryzacji nie inaktywuje przetrwalników *B. cereus*, które po pasteryzacji kiełkują do

form wegetatywnych. We francuskich bankach mleka *B. cereus* był izolowany z próbek zarówno przed jak i po pasteryzacji. Decousser i wsp. (2013) opisali ciężkie zakażenia jelitowe u noworodków (wiek ciążowy 29-30 tydzień) we Francji. Do zakażenia dochodziło w wyniku żywienia pasteryzowanym mlekiem pozyskanym z banku mleka (Decousser i wsp., 2013; Adjidé i wsp., 2020; Cormontagne i wsp., 2021; Jandová i wsp., 2021; Strom i wsp., 2022).

Enterobacter cloacae jest Gram-ujemną bakterią odpowiedzialną za zakażenia szpitalne u wrażliwych pacjentów na oddziałach intensywnej terapii noworodków. W literaturze naukowej opisywane są przypadki wyizolowania *E. cloacae* z mleka kobiecego. Weems i wsp. (2015) opisali przypadek sepsy u wcześniaka karmionego odciągniętym mlekiem matki. Za wywołanie sepsy odpowiedzialny był szczep *Enterobacter cloacae*, który wyizolowano z organizmu dziecka, cewnika centralnego oraz mleka, którym było karmione (Weems i wsp. 2015; Gad i wsp., 2021).

Bakterie patogenne mogą wnikać do mleka podczas obiegu mleka: dawczyni – bank mleka kobiecego – oddział neonatologiczny – noworodek, jako wynik nieprawidłowej higieny przygotowania mleka (rozmrzanie, przechowywanie, przelewanie, dozowanie), nieprawidłowego sposobu mycia i dezynfekcji butelek i sprzętu wykorzystywanego do przygotowania mleka. Istotnym jest fakt, że bakterie, które mogą być zagrożeniem dla noworodków, mogą tworzyć biofilm na powierzchniach.

Biofilm bakteryjny może oderwać się od przylegającej powierzchni. Etap ten stanowi istotne zagrożenie mikrobiologiczne, ponieważ uwolnione z biofilmu bakterie mogą przyczynić się do wystąpienia zakażenia. Biofilm może powstać na powierzchniach, które mają kontakt z mlekiem kobiecym (np. butelki do karmienia, rurki enteralne, laktatory), a jeżeli dojdzie do jego dyspersji to komórki bakterii wnukną do organizmu dziecka.

Niezwykle ważne jest poznanie wpływu różnych czynników środowiskowych na rozwój biofilmu. Pomoc w tym może mikrobiologia prognostyczna. W ostatnich latach podjęto próby opracowania matematycznych modeli prognostycznych tworzenia biofilmu opisujących wykorzystanie substratu i dynamikę tworzenia biofilmu (Tango i wsp., 2018; Hu i wsp., 2022). Dalszy rozwój mikrobiologii prognostycznej może przyczynić się do zrozumienia roli różnych warunków środowiskowych w tworzeniu biofilmu. W niniejszej pracy podjęto próbę opracowania prognostycznego modelu tworzenia biofilmu przez bakterie *C. sakazakii* ATCC 29544 i *E. cloacae* na powierzchniach mających kontakt z mlekiem kobiecym. Tego typu model może stanowić

przydatne narzędzie w ocenie i zarządzaniu ryzykiem zakażeń noworodków w placówkach odpowiedzialnych za jakość mikrobiologiczną mleka kobiecego.

2. Cel pracy, hipotezy badawcze i zakres pracy

2.1 Cel pracy

Celem pracy doktorskiej była ocena zdolności tworzenia biofilmu na różnych powierzchniach, przez szczep *Cronobacter sakazakii* ATCC 25944 i przez wyizolowane z mleka kobiecego bakterie patogenne oraz konstrukcja matematycznego modelu prognostycznego, opisującego tworzenie biofilmu na powierzchniach mających kontakt z mlekiem kobiecym.

2.2 Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

Rozprawę doktorską pt. „Prognostyczny model zdolności tworzenia biofilmu przez bakterie patogenne wyizolowane z mleka kobiecego” stanowi monotematyczny cykl trzech publikacji naukowych.

Publikacje naukowe wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały oznaczone w tekście pracy następującymi symbolami i cyframi:

P1. **Gemba M.**, Rosiak E., Kołożyn-Krajewska D. (2020). *Cronobacter spp.* – **poważne zagrożenie w żywności dla niemowląt**. *Postępy mikrobiologii*, 59, 2, 139-151. DOI: 10.21307/PM-2020.59.2.011

Punkty MNiSW: 20 (wg Komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 18 grudnia 2019 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych wraz z przypisaną liczbą punktów, ogłoszonego przez MNiSW dn. 18.12.2019)

Impact Factor: 0.263

Wkład własny: opracowanie koncepcji badania, przeprowadzenie przeglądu literatury, pisanie, edycja i gromadzenie danych, wizualizacja i napisanie oryginalnego draftu artykułu (51%)

P2. **Gemba M.**, Rosiak E., Nowak-Życzyńska Z., Kałęcka P., Łodykowska E., Kołożyn-Krajewska D. (2022). **Factors Influencing Biofilm Formation by *Salmonella enterica* sv. Typhimurium, *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *Pantoea* spp.,**

and *Bacillus* spp. isolated from human milk determined by PCA analysis. *Foods*, 11, 23, 3862, 14 stron. <https://doi.org/10.3390/foods11233862>

Punkty MNiSW: 100 (wg Komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 1 grudnia 2021 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych wraz z przypisaną liczbą punktów, ogłoszonego przez MNiSW dn. 01.12.2021)

Impact Factor: 5.2

Wkład własny: przeprowadzenie doświadczenia, wykonanie analiz, opisanie wyników, wizualizacja i napisanie oryginalnego draftu artykułu (51%)

P3: Gemba M., Rosiak E., Kołożyn-Krajewska D. (2025). **Development of predictive models of biofilm formation by *C. sakazakii*, *E. cloacae* on surfaces used in the food industry and medicine.** *International Journal of Food Microbiology*, 434, 111131, 9 stron. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111131>

Punkty MNiSW: 100 (wg Komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 5 stycznia 2024 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych wraz z przypisaną liczbą punktów, ogłoszonego przez MNiSW dn. 05.01.2024)

Impact Factor: 5.0

Wkład własny: przeprowadzenie doświadczenia, wykonanie analiz, opis wyników, wizualizacja i napisanie oryginalnego draftu artykułu (51%)

2.3 Hipotezy badawcze

1. Bakterie patogenne przenoszone ze środowiska przez mleko kobiece tworzą biofilm na powierzchniach roboczych w bankach mleka, stanowiąc poważne zagrożenie mikrobiologiczne dla noworodków.
2. Progностyczne modele powstawania biofilmu bakterii *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 i *Enterobacter cloacae* na powierzchniach roboczych w bankach mleka, mogą być przydatnym narzędziem w ocenie i zarządzaniu ryzykiem powstawania biofilmu, w placówkach odpowiedzialnych za jakość mikrobiologiczną mleka kobiecego.

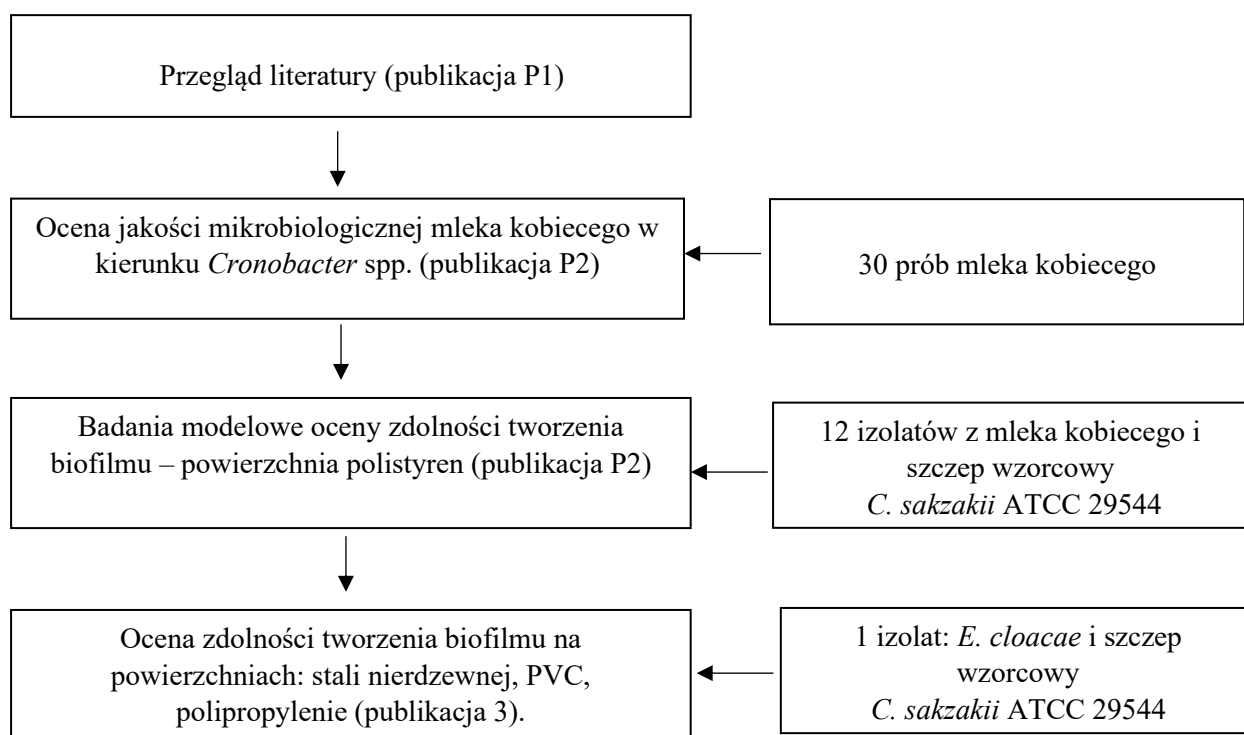
2.4 Zakres badań

Zadanie badawcze nr 1: Przegląd literatury w zakresie występowania bakterii patogennych w mleku kobiecym (publikacja P1).

Zadanie badawcze nr 2: Ocena jakości mikrobiologicznej mleka kobiecego w kierunku *Cronobacter* spp. i badania modelowe oceny zdolności tworzenia biofilmu przez izolaty bakteryjne mleka kobiecego na powierzchni polistyrenu, w wybranych parametrach czasu, temperatury i koncentracji bakterii (publikacja P2).

Zadanie badawcze nr 3: Ocena zdolności tworzenia biofilmu na trzech badanych powierzchniach (medyczny polichlorek winylu – PVC, stal nierdzewna, polipropylen) przez bakterie patogenne wyizolowane z mleka kobiecego: *Enterobacter cloacea* i szczep wzorcowy *Cronobacter sakzakii* ATCC 29544 oraz konstrukcja matematycznego, prognostycznego modelu tworzenia biofilmu (publikacja P3).

Zadania badawcze przedstawiono na rysunku nr 1.



Rysunek 1. Schemat badania naukowego i wykorzystany materiał badawczy.

Źródło: opracowanie własne

3. Materiał i metodyka badań

3.1 Materiał badawczy

Materiał badawczy do zadania nr 1 stanowiły publikacje naukowe opisujące mikrobiologię mleka kobiecego (zadanie badawcze nr 1, publikacja P1).

Do oceny jakości mikrobiologicznej mleka kobiecego w kierunku *Cronobacter* spp. wykorzystano trzydzieści próbek mleka kobiecego (oznaczonych kolejno kodami CIM- CIM30) pozyskanego z regionalnego banku mleka kobiecego znajdującego się w Szpitalu Specjalistycznym im. Świętej Rodziny w Warszawie. Próby mleka pobierane były do jałowych próbek przez personel medyczny, następnie transportowane do Katedry Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności Instytutu Nauk o Żywieniu Człowieka SGGW w Warszawie, w warunkach chłodniczych (4 °C). Próby mleka przechowywano w warunkach zamrożenia (-18 °C). Szczep wzorcowy *C. sakazakii* ATCC 29544 pochodził z kolekcji szczepów American Type Culture Collection (kontrola pozytywna).

Wyizolowane z mleka kobiecego bakterie (dwanaście izolatów) i szczep wzorcowy *C.sakazakii* ATCC 29544 posłużyły do modelowych badań oceny zdolności tworzenia biofilmu na adherentnych mikroplastykach polistyrenowych, 96-dółkowych, typu F (Nest Scientific Biotechnology, Chiny) (zadanie badawcze nr 2, publikacja P2).

Do konstrukcji matematycznego prognostycznego modelu zdolności tworzenia biofilmu wykorzystano trzy powierzchnie: stal nierdzewna AISI 304 (Hempel, Szwajcaria), PVC (Sumi, Polska), polipropylen (NUK MedicPro, Niemcy) oraz izolat bakterii patogenicznej *E. cloacae* i szczep wzorcowy *C. sakazakii* ATCC 29544. Do kolejnych badań wybrano izolat *E. cloacae*, ponieważ w pierwszym etapie badań biofilmu izolat ten tworzył silny biofilm na powierzchni modelowej (zadanie badawcze nr 2) oraz *C. sakazakii* ATCC 29544 ze względu na fakt opisywanych w literaturze naukowej, zgłaszanych incydentów zakażeń wśród noworodków.

Powierzchnie, które wybrano do badań są powierzchniami, które mają kontakt z żywnością i z mlekiem kobiecym. Z polichlorku winylu wykonuje się m. in. rurki do żywienia enteralnego. Polipropylen jest wykorzystywany do produkcji butelek do przechowywania i karmienia niemowląt, stal nierdzewna jest przykładem niskoadhezyjnej powierzchni szeroko stosowanej w laboratoriach, przemyśle spożywczym i gastronomii (zadanie badawcze nr 3, publikacja P3).

3.2 Metody badawcze

3.2.1 Zadanie badawcze nr 1 - przegląd literatury w zakresie występowania bakterii patogennych w mleku kobiecym (publikacja P1)

Przegląd literatury wykonano przez przeszukanie bazy artykułów naukowych PubMed oraz Google Scholar. Publikacje wyszukiwano wpisując w języku angielskim kombinację różnych słów kluczowych: mleko kobiece/ zanieczyszczenie/ bakterie patogenne/ *C. sakazakii*/ bank mleka kobiecego/ kontaminacja/ biofilm.

3.2.2 Zadanie badawcze nr 2 - ocena jakości mikrobiologicznej mleka kobiecego w kierunku *Cronobacter* spp. i badania modelowe oceny zdolności tworzenia biofilmu przez izolaty bakteryjne mleka kobiecego na powierzchni polistyrenu w wybranych parametrach czasowych i temperaturowych (publikacja P2).

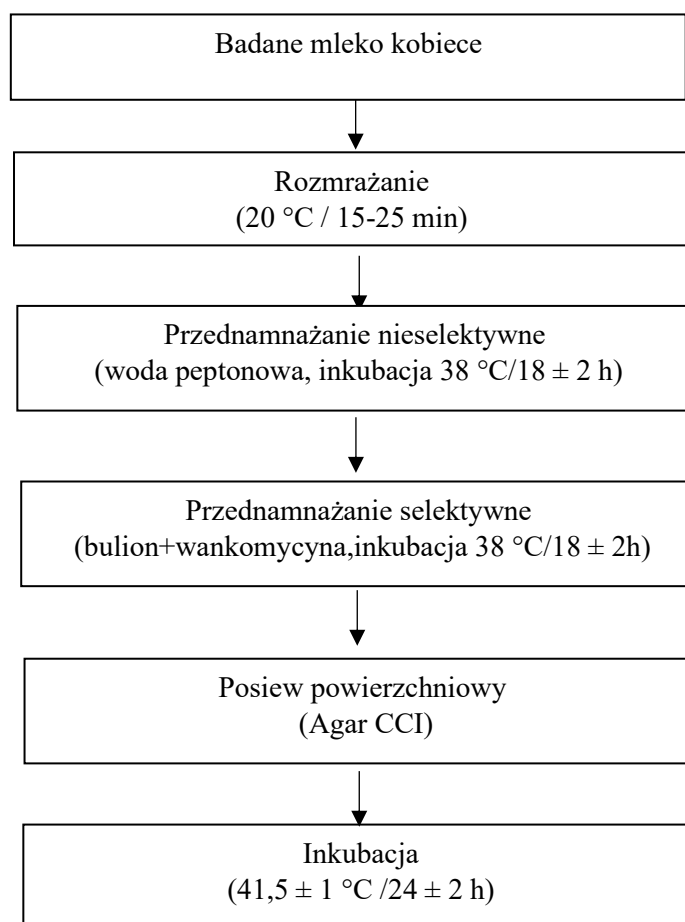
Jakość mikrobiologiczną mleka kobiecego w kierunku występowania w mleku kobiecym bakterii *Cronobacter* spp., oceniono metodą płytkową i testem biochemicznym.

Analizy przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w normie EN ISO 22964:2017. Po 1 ml każdej próby mleka, uprzednio rozmrożonego w temperaturze 20 °C przez około 15-25 minut, dodano do sterylnej zbuforowanej wody peptonowej (LabM Limited, UK). Po inkubacji (38 °C, 18 ± 2 h) 0,1 ml próby dodano do 10 ml selektywnego bulionu wzbogacającego z 10 mg/l wankomycyny (CSEB-ISO) (LabM Limited, UK; Vancomycin Supplement, OXOID) w celu selektywnego namnażania *Cronobacter* spp. Po 18 ± 2 h inkubacji w 38 °C próby dokładnie wymieszano na mieszadło mechaniczne Wortex (Nemko, VELP Scientifica), a następnie wykonano posiew powierzchniowy w dwóch powtórzeniach na Chromogenic *Cronobacter* Isolation Agar (CCI) Rapid`Sakazakii (Bio-Rad, Francja) i inkubowano w temperaturze 41,5 ± 1 °C przez 24 ± 2 h (EN ISO 22964:2017) (rysunek 2).

Przypuszczalne, charakterystyczne kolonie *Cronobacter* (niebiesko-zielone zabarwienie) rosnące na selektywnym agarze CCI, wysiano na nieselektywny agar Tryptone Soy (TSA) (Merck, Niemcy), w celu sprawdzenia czystości i poddano fenotypowaniu przy użyciu zestawu testów biochemicznych (ID32E, wersja 4.0

Biomerieux, Francja), zgodnie z instrukcją producenta. Kontrolę pozytywną stanowił szczep *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544.

W celu wyizolowania DNA bakterii wykorzystano, zgodnie z instrukcją producenta, zestaw Extreme DNA Bacteria Kit (Blirt, Polska). Sekwencjonowanie przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific) w objętości 10 µl, z oczyszczaniem obejmującym zestaw BigDye XTerminator™ Purification Kit (ThermoFisher Scientific). Sekwencje dopasowano w oprogramowaniu BioEdit v.7.0.5.3. Ostatecznie sekwencje konsensusowe 16s rRNA porównano z bazą danych NCBI, stosując nukleotyd BLAST.

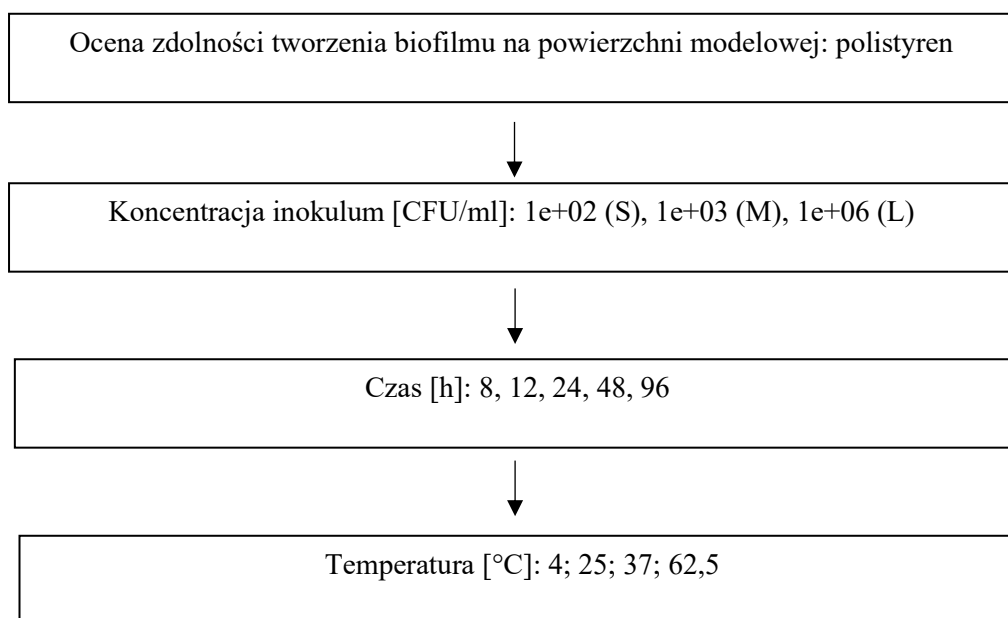


Rysunek 2. Schemat przeprowadzonej oceny jakości mikrobiologicznej mleka kobiecego w kierunku *Cronobacter* spp.

Źródło: opracowanie własne

Do oceny zdolności tworzenia biofilmu na modelowej powierzchni polistyrenu wykorzystano dwanaście izolatów oraz szczep wzorcowy *C. sakazakii* ATCC 29544. Do badania zastosowano następujące temperatury w połączeniu z czasem, liczbą inokulum i rodzajem wariantów powierzchni: 62,5 °C (temperatura pasteryzacji mleka kobiecego w pojemniku), 37 °C (temperatura ciała człowieka), 25 °C i 4 °C (temperatury przechowywania mleka kobiecego w temperaturze pokojowej i w warunkach chłodniczych).

Hodowlę (18 – godziną) izolatów bakterii inkubowano w bulionie Brain Heart Infusion (BHI) (Neogen, Polska) w temperaturze 37 °C. Pożądane stężenie inokulum w hodowlach osiągnięto przez rozcieńczenie nocnej hodowli i uzyskano gęstość bakterii odpowiednio [CFU/ml] (CFU – colony forming unit): 1e+02 (S), 1e+03 (M), 1e+06 (L). Przeprowadzono sześćdziesiąt wariantów wytwarzania biofilmu dla każdego izolatu w różnych wariantach stężenia inokulum, czasu [h] (8, 12, 24, 48, 96) i temperatury [°C] (4, 25, 37, 62,5). Każdy zestaw zmiennych w doświadczeniu kodowano według następującego schematu: koncentracja inokulum (S, M, L)_czas [h] (8, 12, 24, 48, 96)_temperatura [°C] (4; 25; 37; 62,5) (rysunek 3).



Rysunek 3. Schemat badania oceny zdolności tworzenia biofilmu na powierzchni modelowej polistyrenu
Źródło: opracowanie własne

W celu utworzenia biofilmu na mikropłytkach, szczepy bakteryjne hodowano na bulionie BHI, jak opisano powyżej. Trzy studzienki sterylnych 96-studzienkowych płytek polistyrenowych napełniono po 200 μ l zawiesiny bakteryjnej. Dołki z kontrolą ujemną zawierały tylko bulion BHI. Płytki przykryto i inkubowano przez 8, 12, 18, 24, 48 i 96 godzin, w zależności od temperatury. Dodatkowo, 20 μ l zawiesiny bakteryjnej przeniesiono do trzech studzienek innej, sterylnej 96-studzienkowej płytki polistyrenowej zawierającej 180 μ l bulionu BHI i inkubowano w 4; 12; 25; 37; 62,5 $^{\circ}$ C przez 24 h w celu oceny zdolności wzrostu izolatów. Koncentrację komórek bakterii określono spektrofotometrycznie mierząc absorbancję przy 600 nm w stosunku do próby ślepej, którą był bulion BHI. Następnie zawartość każdej płytki usuwano, przepłukano sześć razy wodą i suszono w powietrzu przez 45 minut. Po wysuszeniu studzienki barwiono przez dodanie 200 μ l 1,0 % fioletu krystalicznego (Analab, Polska) przez 30 min. Następnie zawartość studzienek usunięto, przepłukano sześć razy bieżącą wodą wodociągową i suszono w powietrzu przez 45 min. Fiolet krystaliczny związany z biofilmem rozpuszczano w 200 μ l 96 % etanolu (Poch, Polska) przez 10 min. 150 μ l z każdego dołka dodano do nowej sterylnej 96-dołkowej płytki polistyrenowej i określono absorbancję przy 600 nm za pomocą czytnika mikropłytek (SoftMax Pro, USA).

Do oceny intensywności tworzenia biofilmu wykorzystano wartość średnią gęstości optycznej (ang. Optical Density - OD) i gęstość optyczną odcięcia (ang. cut Optical Density - ODc), którą zdefiniowano jako trzykrotne odchylenie standardowe od OD kontroli negatywnej. Na tej podstawie wyniki sklasyfikowano następująco: brak biofilmu (-) $OD_{600} < ODc$; słaby (+) $ODc < OD_{600} < 2 \times ODc$; umiarkowany (++) $2 \times ODc < OD_{600} < 4 \times ODc$; silny (+++) $4 \times ODc < OD_{600}$. Test powtórzono w dwóch oddzielnych doświadczeniach dla każdego szczepu w trzech powtórzeniach, a wyniki uśredniono. Różnice ilościowe siły biofilmu analizowano z wykorzystaniem testu Anova Friedmana; wartości $p < 0,05$ uznano za istotne. Analizę czynników determinujących powstawanie biofilmu na powierzchni polistyrenu oceniono na podstawie analizy głównych składowych (PCA). Powyższe analizy opracowano z użyciem programu Statistica 13.1.

3.2.3 Zadanie badawcze nr 3 - ocena zdolności tworzenia biofilmu na trzech badanych powierzchniach (PVC, stal nierdzewna, polipropylen) przez bakterie patogenne wyizolowane z mleka kobiecego: *E. cloacea* oraz szczep wzorcowy *C. sakazakii* ATCC 29544 i konstrukcja matematycznego prognostycznego modelu tworzenia biofilmu (publikacja P3).

W pierwszym etapie oceniono zdolność tworzenia biofilmu na wybranych powierzchniach, zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 3.2.2. Powierzchnie polipropylenu i PVC pocięto jałowo na fragmenty odpowiednio: 10 mm x 10 mm i 5 mm x 6,5 mm. Stal nierdzewną pocięto na fragment o wymiarach 10 mm x 10 mm i sterylizowano w 121 °C, przez 15 min.

Zdolność tworzenia biofilmu oceniono w warunkach przedstawionych w tabeli nr 1. W przypadku polipropylenu i stali nierdzewnej wybrano temperatury 4, 12 i 25 °C, w których mleko może być przechowywane (4, 12 °C jako temperatura chłodnicza, 25 °C jako temperatura pokojowa). W przypadku medycznego polichlorku winylu wybrano temperaturę 37 °C jako temperaturę wnętrza ciała noworodka (tabela 1). Badanie przeprowadzono w trzech wariantach koncentracji inoculum [CFU/ml]: 1e+03 (S), 1e+05 (M), 1e+07 (L).

Szacowania parametrów modelu powierzchni odpowiedzi dokonano procedurami iteracyjnymi z wykorzystaniem algorytmu Levenberg-Marquardt'a. Liczba iteracji w przypadku każdego modelu nie przekraczała 50. Obliczenia wykonano w programie TableCurve 3D, v.4.0.05 for Windows, SYSTAT Software Inc., wykorzystując nieliniowe funkcje z rodziny Gaussian, Extreme Value, Log Normal i Logistic Peak (tabela 2, publikacja P3). Współczynnik determinacji R^2 oraz zweryfikowany liczbą stopni swobody współczynnik determinacji DF (ang. Degree of Freedom) Adjusted R^2 , wykorzystano do wyjaśnienia zmienności analizowanych zmiennych. Standard Error of Fits (SE) posłużył do szacowania zmienności wartości średniej odpowiedzi dla określonego zestawu wartości predyktorów.

Poprawność dopasowania opracowanych modeli została oceniona statystycznie poprzez wyznaczenie najmniejszej wartości sumy kwadratów błędów pomiędzy wartościami empirycznymi i teoretycznymi – błąd średniokwadratowy (ang. Mean Square Error - MSE). Wykonano również weryfikację graficzną 3D, opracowanych modeli poprzez porównanie obserwowanych i prognozowanych wartości OD.

Tabela 1. Powierzchnie, czas i temperatura tworzenia biofilmu.

Powierzchnia	Temperatura [°C]			
	4	12	25	37
Medyczny polichlorek winylu (PVC)	-	-	-	3,6,9,12,18,24,30,36 h
Stal nierdzewna	3,12,24,36, 48,60, 72 h	3,6,9,12,18,24,36, 48 h	3,6,9,12,18,24,36, 48 h	-
Polipropylen	3,12,24,36, 48,60, 72 h	3,6,9,12,18,24,36, 48 h	3,6,9,12,18,24,36, 48 h	-

Źródło: opracowanie własne

4 Wyniki badań

4.1 Zadanie badawcze nr 1 - przegląd literatury w zakresie występowania bakterii patogennych w mleku kobiecym (publikacja P1)

Z mleka kobiecego izolowane są różne bakterie patogenne, np. *Bacillus* spp., *Cronobacter* spp., *E. coli*, *S. aureus*. Jednakże w przeprowadzonym przeglądzie literatury skupiono się na bakterii *Cronobacter* spp., ponieważ w zadaniu badawczym nr 2 dokonano oceny jakości mikrobiologicznej mleka kobiecego w kierunku *Cronobacter* spp. Celem zadania był przegląd literatury na temat oceny występowania zagrożenia powodowanego przez bakterie *Cronobacter* spp. w żywności w świetle obowiązujących wymagań. Na podstawie przeprowadzonego przeglądu literatury opracowano publikację pt. „*Cronobacter* spp. – poważne zagrożenie w żywności dla niemowląt”, którą opublikowano w czasopiśmie Postępy mikrobiologii (publikacja P1).

Publikacja składa się z jedenastu rozdziałów, spis piśmiennictwa obejmuje 102 pozycje literaturowe.

Wprowadzenie obejmuje informacje ogólne o *Cronobacter* spp. oraz cel publikacji.

Rozdział nr dwa poświęcono objawom i chorobotwórczości *Cronobacter* spp. Na zakażenia wywołane przez bakterie *Cronobacter* spp. narażone są noworodki poniżej 28 dnia życia, noworodki urodzone przedwcześnie, niemowlęta o niskiej masie urodzeniowej, poniżej 2,5 kg (Pei i wsp., 2019). Niektóre gatunki *Cronobacter* spp. przekraczają barierę krew-mózg, m.in. *C. sakazakii*, który może wywołać zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie komórek nerwowych, tworzyć ropnie i torbiele mózgu prowadząc do wodogłowia. Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, wywołanych zakażeniem *C. sakazakii* w 94% przypadków pozostawia nieodwracalne powikłania neurologiczne np. niedowład kończyn, zaburzenia wzroku i słuchu, wodogłowie (Dancer i wsp., 2009). W tabeli 1, publikacji P1 przedstawiono wybrane infekcje noworodków wywołanych przez bakterie *Cronobacter* spp.

W rozdziale trzecim przedstawiono wymagania prawne. We wrześniu 2004 r. Komisja Naukowa do spraw Zagrożeń Biologicznych Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności wydała opinię dotyczącą zagrożeń mikrobiologicznych w

preparatach dla niemowląt i preparatach pochodnych. W opinii stwierdzono, że drobnoustrojami wymagającymi szczególnej uwagi są: *Salmonella* i *C. sakazakii*. Uznano, że jeśli preparat dla niemowląt nie będzie przygotowany zgodnie z zasadami higieny, może stanowić znaczne ryzyko. Eksperti FAO/WHO w wyniku przeprowadzonej oceny ryzyka zaklasyfikowali bakterie *Cronobacter* spp. i *Salmonella* do kategorii A – wysoki związek przyczynowo skutkowy zakażeń niemowląt w wyniku spożycia mieszanek mlekozastępczych.

Zgodnie z Rozporządzeniem Komisji (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. z późn. zm. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych w preparatach w proszku do początkowego żywienia niemowląt i w żywności dietetycznej w proszku, specjalnego przeznaczenia medycznego, przeznaczonej dla niemowląt w wieku sześciu miesięcy, *Cronobacter* spp. powinno być nieobecne w trzydziestu 10 g próbach. Jakość zadowalającą przyjmuje się, jeśli we wszystkich próbach nie stwierdzono obecności bakterii. Jeśli obecność bakterii stwierdzi się nawet w jednej próbce, jakość uznaje się za niezadowalającą.

W rozdziale czwartym opisano dwa podstawowe mechanizmy wirulencji *Cronobacter* spp.: adhezję do komórek nabłonka jelitowego oraz adhezję do komórek śródbłonka naczyń mózgowych (Kim i wsp., 2017).

Taksonomię *Cronobacter* spp. omówiono w rozdziale piątym. Rodzaj *Cronobacter* obejmuje siedem gatunków: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjesii*, *C. universalis*, *C. dublinensis* i *C. condimenti*. Początkowo *C. sakazakii* określano jako *Enterobacter cloacae*. W 1980 r. Farmer i wsp. przeklasyfikował *Enterobacter cloacae* jako nowy gatunek i nazwał na cześć japońskiego mikrobiologa Riichi Sakazakii – *Enterobacter sakazakii*. Po analizie sekwencji genu 16S rRNA różnych szczepów należących do *Enterobacter sakazakii* zaproponowano nazwę rodzaju jako *Cronobacter* (Farmer i wsp., 1980; Iversen i wsp., 2007; Sosnowski i wsp., 2010).

W rozdziale szóstym przedstawiono występowanie bakterii *Cronobacter* spp. w żywności i środowisku szpitalnym. Wykazano, że *Cronobacter* spp. może występować w mieszkankach mlekozastępczych, warzywach liściastych, kiełkach, przetworach zbożowych, ziołach oraz sprzęcie używanym do przygotowania pokarmu dla niemowląt, powierzchniach, przedmiotach i urządzeniach medycznych

(Zhou i wsp., 2011; Lee i wsp. 2012; Li i wsp., 2014; Grabowska i wsp., 2015; Hu i wsp., 2015).

Oporność *Cronobacter* spp. na warunki stresowe, czyli niską aktywność wody, niskie pH, wysoką temperaturę i stres osmotyczny opisano w rozdziale siódmym publikacji P1.

Rozdział ósmy poświęcono biofilmom. Przedstawiono zdolność adhezji *Cronobacter* spp. do stali nierdzewnej, szkła, silikonu, poliwęglanu i plastiku (Gupta i wsp., 2017).

W rozdziale dziewiątym opisano wykrywanie i oznaczanie liczby *Cronobacter* spp. zgodnie z normą EN ISO 22964:2017, a w rozdziale dziesiątym przedstawiono antybiotykooporność *Cronobacter* spp.

Ze względu na produkcję biofilmu i wysoką termotoleracyjność *Cronobacter* jest odporny na wysuszenie i wykazuje przeżywalność m.in. w mieszankach mlekozastępczych. *Cronobacter* spp. wykorzystuje kwas sjałowy jako źródło węgla do wzrostu. Kwas sjałowy występuje w mleku kobiecym, mieszankach mleko zastępczych, mleku modyfikowanym, mucynie wyścielającej jelita i jest składnikiem gangliozydów, które występują w komórce nerwowej i biorą udział w funkcjonowaniu tkanek nerwowych. *Cronobacter* spp. po wnikięciu do organizmu może atakować komórki nabłonkowe jelit, a nawet komórki śródbłónka mikronaczyniowego mózgu wykazując potencjał do wywoływania zapalenia opon mózgowych.

W podsumowaniu stwierdzono, że bakterie *Cronobacter* spp. powszechnie występują w środowisku naturalnym i mogą stanowić poważne zagrożenie dla zdrowia i życia niemowląt.

4.2 Zadanie badawcze nr 2 - ocena jakości mikrobiologicznej mleka kobiecego w kierunku *Cronobacter* spp. i badania modelowe oceny zdolności tworzenia biofilmu przez izolaty bakteryjne mleka kobiecego na powierzchni polistyrenu w wybranych parametrach czasowych, temperaturowych i gęstości inokulum (publikacja P2).

Celem zadania badawczego nr 2 była ocena jakości mikrobiologicznej mleka kobiecego w kierunku *Cronobacter* spp. Wyizolowane bakterie posłużyły do badań modelowych oceny zdolności tworzenia biofilmu na powierzchni polistyrenu. Wyniki badań opublikowano w artykule pt. „Factors influencing biofilm formation by *Salmonella enterica* sv. Typhimurium, *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *Pantoea* spp., and *Bacillus* spp. isolated from human milk determined by PCA analysis”, w czasopiśmie Foods (publikacja P2).

Do badań wykorzystano trzydzieści prób mleka kobiecego. W przypadku osiemnastu prób nie zaobserwowano wzrostu kolonii. Dwanaście izolatów bakteryjnych oraz kontrola pozytywna *C. sakazakii* ATCC 29544 na pożywce Chromogenic *Cronobacter* isolation Agar – CCI wykazywało typowy niebiesko-zielony wygląd kolonii. Izolat CIM16 wykazywał niebiesko-żółty wzrost, a CIM30 bladoniebieski. Izolaty CIM1, CIM2, CIM13, CIM20 były niebieskie. Po przeprowadzeniu oceny wzrostu wykonano badanie biochemiczne, w wyniku którego otrzymano wyniki niejednoznaczne. W kolejnym etapie przeprowadzono izolację i sekwencjonowanie DNA bakteryjnego.

Wyizolowane z mleka kobiecego izolaty wykazujące typowy wzrost na pożywce mikrobiologicznej CCI nie należały do *Cronobacter* spp. Na podstawie sekwencjonowania zidentyfikowano następujące rodzaje i gatunki izolatów: *Klebsiella* spp. (n=5), *Bacillus* spp. (n=1), *Pantoea* spp. (n=1), *S. enterica* subsp. *enterica* sv. *Typhimurium* (n=1), *Enterobacter hormaechei* (n=2) oraz *E. cloacae* (n=2) (tabela 2).

Wyizolowane z mleka kobiecego bakterie zostały wykorzystane do badania oceny zdolności tworzenia biofilmu na modelowej powierzchni polistyrenu.

Tabela 2. Identyfikacja izolatów na podstawie sekwencjonowania.

Izolaty	Wynik identyfikacji na podstawie sekwencjonowania
CIM	<i>Salmonella enterica</i> sv. Typhimurium
CIM1	<i>Klebsiella</i> spp. 1
CIM2	<i>Bacillus</i> spp.
CIM3	<i>Pantoea</i> spp.
CIM4	<i>Klebsiella</i> spp. 2
CIM8	<i>Klebsiella</i> spp. 3
CIM11	<i>Enterobacter hormaechei</i> 1
CIM13	<i>Enterobacter cloace</i> 1
CIM16	<i>Enterobacter cloace</i> 2
CIM20	<i>Enterobacter hormaechei</i> 2
CIM21	<i>Klebsiella</i> spp. 4
CIM30	<i>Klebsiella</i> spp. 5

Źródło: opracownie własne

Tworzenie biofilmu oceniono w trzech koncentracjach inokulum ($1e+02$ - S, $1e+03$ - M, $1e+06$ - L), pięciu wariantach czasowych (8, 12, 24, 48, 96 h) i czterech wariantach temperatury (4; 25; 37; 62,5 °C).

Na powierzchni polistyrenu izolaty bakterii nie wytworzyły biofilmu w temperaturze 4 °C (w czasie 8-96 h), z wyjątkiem bakterii *Klebsiella* spp. 4, *Klebsiella* spp. 5, *Pantoea* spp., *E. cloacae* 2, które wytworzyły słaby biofilm (Tabela 3). W temperaturze 62,5 °C tylko 5 izolatów tworzyło biofilm, jednak większość izolatów wykazywała wzrost w temperaturze do 8 h inkubacji, w 48 h inkubacji żaden z badanych izolatów nie wykazał wzrostu. Biofilm słaby wyprodukowały bakterie *Klebsiella* spp. 1, *Klebsiella* spp. 2, *S. enterica* sv. Typhimurium, *E. hormachei* 2, a biofilm silny *Pantoea* spp. (Tabela 3).

Tworzenie biofilmu w temperaturze 25 °C i 37 °C przedstawiono w tabeli nr 1, w publikacji P2. W temperaturze 25 °C *Pantoea* spp., *S. enterica* sv. Typhimurium i *E. cloacae* 1 nie tworzyły biofilmu w czasie 8-48 h. Po 8 godzinach inkubacji w temperaturze 25 °C żaden z izolatów, jak również szczep wzorcowy *C. sakazakii* ATCC 29544 nie tworzyły biofilmu, niezależnie od koncentracji inokulum. Przy niskiej koncentracji inokulum (S) nie zaobserwowano tworzenia się biofilmu w przypadku 58% izolatów do 48 godzin. Średnie i duże inokulum (M i L) zwiększały odsetek szczepów tworzących biofilm w ciągu 24 godzin inkubacji, natomiast po 48

godzinach inkubacji odpowiednio 75% i 83% szczepów nie tworzyło już biofilmu (tabela 2, publikacja P2). Większość izolatów utworzyła silny biofilm po 12 godzinach inkubacji przy koncentracji inokulum M (tabela 1, publikacja P2).

Izolaty *Klebsiella* spp. 2 i 4 nie tworzyły biofilmu również po 12 godzinach inkubacji. Silny biofilm w tej temperaturze wytwarzał *Bacillus* spp. po 12 h inkubacji i *E. cloacae* 2 niezależnie od koncentracji inokulum oraz *Klebsiella* spp. 1 (inokulum małe i średnie). Po 48 h inkubacji szczepy analizowanych bakterii nie tworzyły biofilmu (27 przypadków), tworzyły słaby (5 przypadków) lub średni (4 przypadki) biofilm. Wyjątkiem był szczep *E. cloacae* 2, który wytworzył bardzo silny biofilm w temperaturze 25 °C również po 48 h. W temperaturze 37 °C najsilniejszy biofilm, niezależnie od koncentracji inokulum tworzyły *Bacillus* spp., *E. cloacae* 2, *Klebsiella* 1, 3, 5.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń nie można jednoznacznie wyznaczyć optymalnych warunków temperaturowych dla rozwoju biofilmu. W przypadku niektórych szczepów obniżenie temperatury inkubacji może zmniejszyć wzrost bakterii, ale sprzyjać wytwarzaniu biofilmu. Oprócz czynników temperaturowych i czasowych badania wykazano, że indywidualne cechy szczepów istotnie wpływają na wytwarzanie biofilmu.

Szczep wzorcowy *C. sakazakii* ATCC 29544 tworzył średni biofilm w temperaturze 25 °C po 24 h inkubacji przy średnim i dużym dodatku inokulum, natomiast w temperaturze 37 °C produkował średni biofilm po 12 h, niezależnie od koncentracji inokulum. W pozostałych warunkach tworzył słaby biofilm lub go nie tworzył. Szczep wzorcowy *C. sakazakii* ATCC 29544 nie wykazywał cech tworzenia silnego biofilmu w badanych warunkach.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą oprogramowania Statistica 13.1. Opracowano wielowymiarową analizę składowych głównych (PCA). Wyniki analizy składowych głównych warunków tworzenia biofilmu na powierzchni modelowej (polistyren) przez badane izolaty bakterii przedstawiono na rysunku 2, publikacji P2. Wartości współczynnika korelacji R^2 , wyjaśniające procentową zmienność czynników tworzenia biofilmu według głównych składowych, przedstawiono w tabeli nr 4, publikacji P2.

Analiza PCA pozwoliła na zidentyfikowanie struktury zmiennych odpowiedzialnych za tworzenie biofilmu, w ograniczonej przestrzeni określonej przez

dwie składowe (C1 i C2) (tabela 4, publikacja P2). W temperaturze 25°C w przypadku *C. sakazakii* ATCC 29544, *Bacillus* spp. oraz *E. cloacae* pierwsza składowa, z którą uzyskano wysokie wartości współczynnika korelacji to temperatura, ponieważ przy zmieniającej się gęstości inokulum i czasie współczynniki korelacji wynosiły 0,52-0,99. W przypadku bakterii *E. hormachei* 2 oraz *E. cloacae* 2 przy stałej koncentracji inokulum uzyskiwano wysokie wartości zarówno ze składową C1 jak i C2. Dlatego drugą składową C2 decydującą o powstawaniu biofilmu jest czas.

W temperaturze 37 °C składowa 1 (temperatura) decydowała o tworzeniu biofilmu w przypadku *S. enterica* sv. Typhimurium i w większości układów *E. claoacae* 2. Natomiast w przypadku pozostałych drobnoustrojów decydowały obie wyodrębnione składowe główne, czyli czas i gęstość inokulum. Przeprowadzona wielowymiarowa analiza składowych głównych wykazała, że w badanych temperaturach 25 i 37 °C, analizowane czynniki decydujące o tworzeniu biofilmu są różne, w zależności o gatunku i szczepu bakterii.

Tabela 3. Tworzenie biofilmu na powierzchni polistyrenu w zależności od wielkości inoculum, czasu oraz temperatury inkubacji (4 i 62,5 °C)

Izolaty	Koncentracja a inoculum [cfu/ml]	Temperatura 4°C						Temperatura 62,5°C				
		Wzrost t 4°C/ 96h	Czas tworzenia biofilmu [h]					Wzrost 62,5°C/48 h	Czas tworzenia biofilmu [h]			
			8	1 2	2 4	4 8	9 6		8	12	2 4	4 8
<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544	S (1e+02)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M (1e+03)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L (1e+06)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i> spp. 1	S (1e+02)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	M (1e+03)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L (1e+06)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Klebsiella</i> spp. 2	S (1e+02)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M (1e+03)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L (1e+06)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Klebsiella</i> spp. 3	S (1e+02)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M (1e+03)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L (1e+06)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i> spp. 4	S (1e+02)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M (1e+03)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L (1e+06)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i> spp. 5	S (1e+02)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M (1e+03)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L (1e+06)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> spp.	S (1e+02)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M (1e+03)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L (1e+06)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pantoea</i> spp.	S (1e+02)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M (1e+03)	-	-	-	-	-	-	-	-	++ +	-	-
	L (1e+06)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> sv. Typhimurium	S (1e+02)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	M (1e+03)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L (1e+06)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter hormaechei</i> 1	S (1e+02)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M (1e+03)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L (1e+06)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter hormaechei</i> 2	S (1e+02)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	M (1e+03)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L (1e+06)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> 1	S (1e+02)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M (1e+03)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L (1e+06)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> 2	S (1e+02)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M (1e+03)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L (1e+06)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

-Brak biofilmu, + słaby biofilm, ++ umiarkowany biofilm, +++ silny biofilm.

Źródło: opracowanie własne

4.3 Zadanie badawcze nr 3 - ocena zdolności tworzenia biofilmu na trzech badanych powierzchniach (PVC, stal nierdzewna, polipropylen) przez bakterie patogenne wyizolowane z mleka kobiecego: *E. cloacea* i szczep wzorcowy *C. sakazakii* ATCC 29544 oraz konstrukcja matematycznego prognostycznego modelu tworzenia biofilmu (publikacja P3)

Celem zadania nr 3 była konstrukcja matematycznego prognostycznego modelu tworzenia biofilmu przez izolat *E. cloacae* nr 2 oraz szczep wzorcowy *C. sakazakii* ATCC 29544, na powierzchni PVC, stali nierdzewnej i polipropylenie. Wyniki opublikowano w artykule pt. „Development of predictive models of biofilm formation by *C. sakazakii*, *E. cloacae* on surfaces used in the food industry and medicine”, w czasopiśmie International Journal of Food Microbiology.

Pietwszy etap badań polegał na ocenie zdolność tworzenia biofilmu przez badane izolaty i szczep wzorcowy *C. sakazakii* ATCC 29544 na trzech badanych powierzchniach. W tabeli 1 przedstawiono warianty doświadczenia.

PVC, czyli medyczny polichlorek winylu to materiał, który jest wykorzystywany do produkcji rurek enteralnych. Zdolność tworzenia biofilmu oceniono w w temperaturze 37 °C, odpowiadającej temperaturze ciała ludzkiego. *E. cloacae* spośród badanych bakterii wykazywał tworzenie silnego biofilmu na rurkach enteralnych. Próby inkubowano do 36 godzin i obserwowano biofilm *E. cloacae* w każdym badanym zakresie czasowym, z wyjątkiem 3 i 30 godziny inkubacji. W 36 h *E. cloacae* produkował biofilm słaby i umiarkowany. W przypadku *C. sakazakii* ATCC 29544 biofilm obserwowano tylko w 12 i 24 godzinie inkubacji (tabela 3, publikacja P3).

Do oceny tworzenia biofilmu na powierzchni stali nierdzewnej i polipropylenie wykorzystano trzy temperatury: 4 °C, 12 °C (temperatura chłodnicza) i 25 °C (temperatura pokojowa).

Na powierzchni stali nierdzewnej, w 4 °C biofilm zaobserwowano w 36, 48 i 60 h inkubacji. W 48 h inkubacji wszystkie szczepy tworzyły biofilm (dominował biofilm silny), a w 60 h inkubacji biofilm tworzył jedynie *C. sakazakii* ATCC 29544 – był to biofilm umiarkowany (tabela 4 publikacja P3). *E. cloacae* tworzył biofilm słaby w 6 i 24 h. W 12, 18, 36 i 48 h biofilm umiarkowany i silny. *C. sakazakii* ATCC 29544 tworzył biofilm słaby i umiarkowany w 9, 24, 36 i 48 h (tabela 4). W

temperaturze 25 °C intensywność tworzenia biofilmu zwiększyła się. *E. cloacae* tworzył biofilm silny i umiarkowany od 6 h. *C. sakazakii* ATCC 29544 tworzył biofilm w 12, 18, 36 i 48 h. Intensywność tworzenia była najczęściej proporcjonalna do koncentracji inokulum (tabela 4).

Na powierzchni polipropylenu w 4 °C biofilm wyprodukowały wszystkie badane bakterie w 36 i 48 h inkubacji (tabela 5 publikacja P3). W 12 °C w 36 i 48 h wszystkie szczepy tworzyły biofilm, w przypadku *E. cloacae* był to biofilm silny, a w przypadku *C. sakazakii* ATCC 29544 słaby i umiarkowany. W 25 °C intensywność tworzenia biofilmu wzrosła. *E. cloacae* tworzył biofilm od 6 h słaby i umiarkowany, a od 12 h tworzył się biofilm silny. *C. sakazakii* ATCC 29544 tworzył słaby biofilm od 6 h. Jedynie po 24 i 36 h zaobserwowano biofilm umiarkowany i silny (tabela 5).

Tabela 4. Tworzenie się biofilmu na powierzchni ze stali nierdzewnej w różnych kombinacjach wielkości inokulum, czasu i temperatury inkubacji.

Izolaty	Koncentracja inokulum [cfu/ml]	Temperature 12 °C							
		Czas tworzenia biofilmu [h]							
		3	6	9	12	18	24	36	48
<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544	1e+03 (S)	-	-	-	-	-	-	-	-
	1e+05 (M)	-	-	+	-	-	++	+	-
	1e+07 (L)	-	-	-	-	-	++	++	+
<i>Enterobacter cloacae</i> 2	1e+03 (S)	-	-	-	-	+	-	+++	-
	1e+05 (M)	-	-	-	++	++	-	+++	+++
	1e+07 (L)	-	+	-	+++	+++	+	+++	+++
Izolaty	Koncentracja inokulum [cfu/ml]	Temperatura 25 °C							
		Czas tworzenia biofilmu [h]							
		3	6	9	12	18	24	36	48
<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544	1e+03 (S)	-	-	-	-	+	-	++	+
	1e+05 (M)	-	-	-	++	++	-	++	++
	1e+07 (L)	-	-	-	+++	+	-	++	+++
<i>Enterobacter cloacae</i> 2	1e+03 (S)	-	-	-	+++	++	+++	+++	+++
	1e+05 (M)	-	-	-	+++	++	+++	+++	+++
	1e+07 (L)	-	++	++	+++	++	+++	+++	+++

-Brak biofilmu, + słaby biofilm, ++ umiarkowany biofilm, +++ silny biofilm.

Źródło: opracowanie własne

Tabela 5. Tworzenie się biofilmu na powierzchni z polipropylenu w różnych kombinacjach wielkości inokulum, czasu i temperatury inkubacji.

Izolaty	Koncentracja inoculum [cfu/ml]	Temperatura 12 °C							
		Czas tworzenia biofilmu [h]							
		3	6	9	12	18	24	36	48
<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544	1e+03 (S)	-	-	-	-	-	-	-	++
	1e+05 (M)	-	-	-	-	-	-	+	+
	1e+07 (L)	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	1e+03 (S)	-	-	-	-	+	-	+++	+
	1e+05 (M)	-	-	-	++	++	-	+++	+++
	1e+07 (L)	-	-	-	+++	+++	+	+++	+++
Izolaty	Koncentracja inoculum [cfu/ml]	Temperatura 25 °C							
		Czas tworzenia biofilmu [h]							
		3	6	9	12	18	24	36	48
<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544	1e+03 (S)	-	+	-	-	-	-	++	-
	1e+05 (M)	-	-	+	-	-	++	++	-
	1e+07 (L)	-	-	+	+	+	+	+++	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	1e+03 (S)	-	+	+	+++	+	+++	+++	+++
	1e+05 (M)	-	-	-	+++	++	+++	+++	+++
	1e+07 (L)	-	++	++	+++	+++	+++	+++	+++

-Brak biofilmu, + słaby biofilm, ++ umiarkowany biofilm, +++ silny biofilm.

Źródło: opracowanie własne

Matematyczne prognostyczne modele zdolności tworzenia biofilmu na powierzchni stali nierdzewnej i polipropylenu opracowano dla temperatury 4 °C (jako temperatura chłodnicza, przechowywania mleka kobiecego). W przypadku powierzchni PVC model opracowano dla temperatury 37 °C (temperatura wnętrza ciała noworodka).

Na podstawie danych eksperymentalnych opracowano modele powierzchni odpowiedzi dwóch zmiennych niezależnych (czas i koncentracja inokulum). W tabeli numer 6, publikacji P3 przedstawiono estymacje parametrów funkcji opracowanych modeli, które mają 4 - 6 parametrów. Najwięcej jest opracowanych (n=5) modeli czteroparametrowych. W przypadku modeli z 4 i 5 parametrami wszystkie oceny parametrów statystycznie istotnie różnią się od zera, na poziomie istotności $p<0,05$, na co wskazuje też wysoka wartość statystyki F. Oznacza to, że parametry zostały

dostatecznie precyzyjnie oszacowane, aby mieć do nich zaufanie oraz, że zmienne występujące w modelu: czas i koncentracja inokulum wywierają istotny wpływ na zmienną zależną powstawania biofilmu.

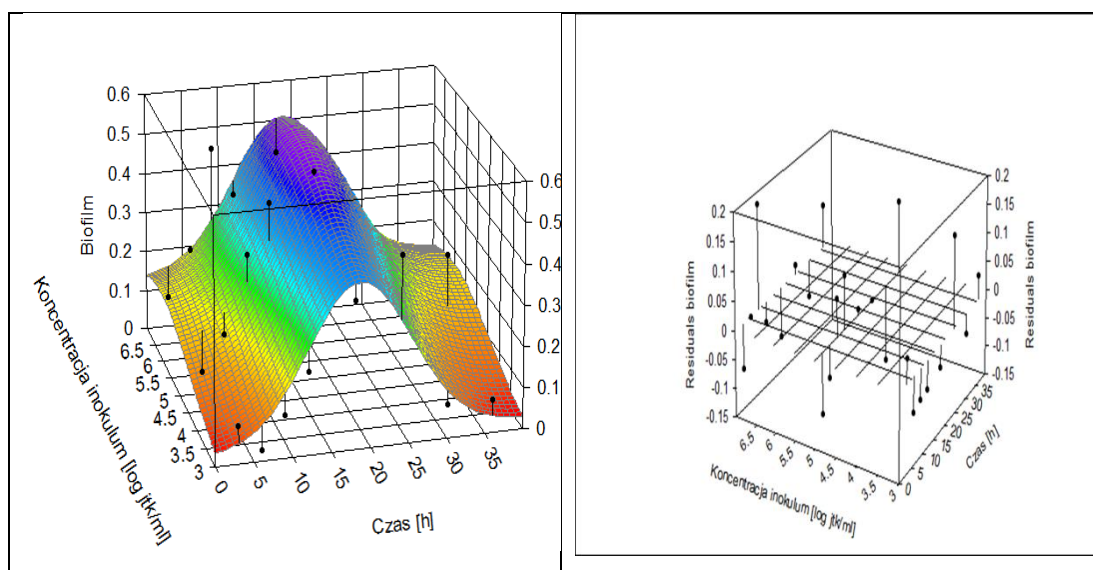
W przypadku modeli z 6 parametrami, parametry e i f nie wywierały istotnego wpływu na zjawisko tworzenia biofilmu. Na uwagę zasługują niskie asymptotyczne błędy średnie szacunku parametrów, pozwalające przyjąć, że parametry zostały dostatecznie precyzyjnie oszacowane, aby mieć do nich zaufanie. Błąd standardowy (SE – Standard Error) został wykorzystywany do generowania przedziału ufności dla prognoz. Natomiast błąd średniokwadratowy MSE (Mean Squared Error) wykorzystywano do charakterystyki i porównań opracowanych modeli. Współczynnik determinacji R^2 jest używany jako ogólna miara dopasowania oszacowanego modelu do danych empirycznych i wyjaśnienia, przez zmienne niezależne, zmienności zmiennej zależnej. Współczynnik determinacji jest miarą siły liniowego związku między danymi. Pozioma płaszczyzna na rysunkach 1 - 6B, publikacji P3 wskazuje, że dane leżą dokładnie na płaszczyźnie, współczynnik determinacji przyjmuje maksymalną wartość ($R^2=1$), a zmienność jest wyjaśniona w 100%; gdy $R^2=0$ nie zachodzi korelacja pomiędzy zmiennymi w modelu, determinacja niczego nie wyjaśnia. W przypadku kiedy współczynnik determinacji przyjmuje wartości $0 < R^2 < 1$ zachodzi związek pomiędzy zmiennymi. Lepsza jakość modelu uzyskiwana jest kiedy zmienne niezależne wyjaśniają 0,80-1,00 zmienności zmiennej zależnej.

Najwyższą wartość współczynnika determinacji jako parametru świadczącego o jakości dopasowania, w przypadku powierzchni medycznego polichlorku winylu (PVC), uzyskano w przypadku modelu *C. sakazakii* ATCC 29544: $R^2=0,756$ (rysunek 1 publikacja P3). W modelu *E. cloacae* wartość $R^2= 0,723$ (rysunek 4, rysunek 2 publikacja P3).

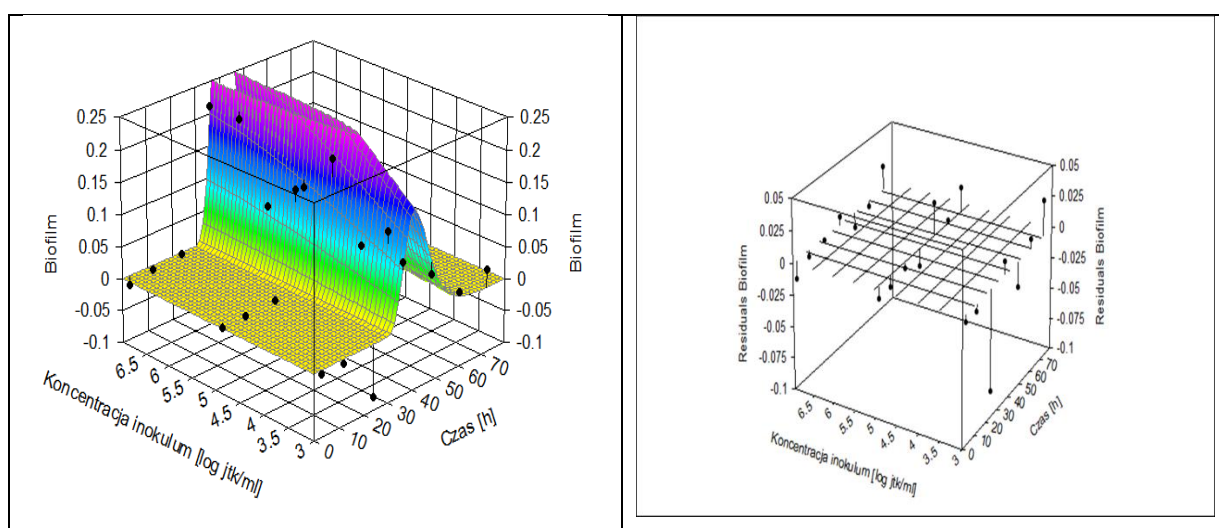
W przypadku powierzchni stali nierdzewnej dopasowanie opracowanego modelu *E. cloacae* wynosiło 0,864 (rysunek 4, publikacja P3). Natomiast współczynnik determinacji w przypadku modelu opisującego tworzenie biofilmu przez *C. sakazakii* ATCC 29544 wynosił 0,707 (rysunek 3, publikacja P3).

Najwyższą wartość współczynnika determinacji w przypadku powierzchni polipropylenu uzyskano w przypadku modelu *C. sakazakii* ATCC 29544 $R^2=0,912$ (rysunek 5, rysunek 5 publikacja P3). W przypadku modelu *E. cloacae* wartość R^2 wynosił odpowiednio: 0,850 (rysunek 6, publikacja P3).

Rysunki 4 i 5 przedstawiają wybrane modele tworzenia biofilmu (zmienna zależna) w funkcji dwóch zmiennych niezależnych determinujących jego powstawanie (czas i gęstość inokulum). Na rysunku 4 przedstawiono model *E. cloacae* na powierzchni PVC, a na rysunku 5 model *C. sakazakii* ATCC 29544 na powierzchni polipropylenu. Oba modele są przedstawione w publikacji nr 3, oznaczone odpowiednio: Fig. 6, Fig. 1.



Rysunek 4. A. Model powierzchni odpowiedzi tworzenia biofilmu; B. Porównanie pomiędzy prognozowanymi i obserwowanymi wartościami ΔOD tworzenia biofilmu przez *E. cloacae* na powierzchni PVC.



Rysunek 5. A. Model powierzchni odpowiedzi tworzenia biofilmu; B. Porównanie pomiędzy prognozowanymi i obserwowanymi wartościami ΔOD tworzenia biofilmu przez *C. sakazakii* ATCC 29544 na powierzchni polipropylenu.

5. Dyskusja wyników

Mleko kobiece jest pierwszym pokarmem dziecka i pełni wyjątkową funkcję w jego żywieniu. Dostępność, jakość i bezpieczeństwo mleka kobiecego mogą decydować o późniejszym stanie zdrowia człowieka. Karmienie mlekiem kobiecym to jeden z elementów programowania żywieniowego. W sytuacji kiedy nie jest możliwe karmienie naturalne mlekiem matki, kluczową rolę pełnią banki mleka kobiecego, które stwarzają szanse potrzebującym w dostępie do mleka.

Mleko kobiece powinno być bezpieczne, wolne od patogenów. Jednakże mleko kobiece może być rezerwuarem bakterii patogennych, stanowiących istotne ryzyko zakażeń wśród noworodków z niską masą urodzeniową lub wcześniaków. Celem niniejszej pracy była ocena zdolności tworzenia biofilmu na różnych powierzchniach, przez szczep *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 i przez wyizolowane z mleka kobiecego bakterie patogene oraz konstrukcja matematycznego modelu prognostycznego, opisującego tworzenie biofilmu na powierzchniach mających kontakt z mlekiem kobiecym.

Przeprowadzony przegląd literatury, który był pierwszą częścią pracy, wskazał na potencjalną możliwość występowania bakterii patogennych w mleku kobiecym m.in.: *E. coli*, *Salmonella* spp., *K. pneumoniae*, *B. cereus* i *E. cloacae* (Mshana i wsp., 2011; Decousser i wsp., 2013; Weems i wsp., 2015; Pawlik i wsp., 2017; Cormontagne i wsp., 2021; Strom i wsp., 2022). Możliwe narażenie na bakterie patogene może przynieść się do rozwoju zapalenia opon mózgowych, sepsy, martwiczego zapalenia jelit, szczególnie u wcześniaków i noworodków z niską masą urodzeniową. Bakterie patogene mogą wnikać do mleka ze skóry matki oraz w wyniku zanieczyszczenia środowiskowego, np. nieodpowiedniej higieny laktatorów. Jiménez i wsp. (2017) zasugerowali, że w mleku kobiet, które odciągały mleko ręcznie jest mniej bakterii, niż w mleku kobiet, które odciągały pokarm z użyciem laktatorów. W przeprowadzonym badaniu własnym potwierdzono przedstawione w przeglądzie literatury dane dotyczące możliwości zanieczyszczenia bakteryjnego mleka, gdyż także wyizolowano z mleka kobiecego bakterie: *Klebsiella* spp., *Bacillus* spp., *Pantoea* spp., *S. enterica* sv. Typhimurium, *E. cloacae*, *E. hormachei*. Próby do badań własnych pozyskano z banku mleka kobiecego w Warszawie. Nie zostało ujawnione, w jaki sposób dawczyni odciągały mleko.

Naukowcy szukają technologii utrwalania mleka kobiecego, które zapewnią bezpieczeństwo mleka, jednocześnie zachowując wartość odżywczą mleka kobiecego na odpowiednio wysokim poziomie. Metodą, która może sprzyjać zachowaniu wartości odżywczej, przy jednoczesnym utrwaleniu mleka kobiecego jest wykorzystanie ciśnieniowania. Malinowska-Pańczyk (2020) opisała wpływ niektórych etapów obchodzenia się z mlekiem kobiecym w bankach mleka kobiecego na zmianę wartości odżywczej mleka. W przeglądzie autorka stwierdziła, że całkowitą inaktywację mikroflory można osiągnąć po poddaniu mleka ciśnieniowaniu w zakresie 500-600 MPa, co niestety wpływa na zmniejszenie wartości odżywczej mleka kobiecego. Niekorzystne zmiany zachodzące w tych warunkach są podobne do zmian w wartości odżywczej po przeprowadzonej pasteryzacji mleka w bankach mleka kobiecego.

W przeprowadzonym badaniu własnym stwierdzono, że bakterie patogenne (*C. sakazakii* ATCC 29544, *Klebsiela* spp., *Bacillus* spp., *Pantoea* spp., *S. enterica* sv. Typhimurium, *E. cloacae*, *E. hormaechei*) mogą tworzyć biofilm na powierzchniach mających kontakt z mlekiem kobiecym. W badaniu modelowym oceny zdolności tworzenia biofilmu na powierzchni polistyrenu wykazano, że intensywność tworzenia biofilmu zależy od czynników środowiskowych: temperatury, czasu, koncentracji inoculum. W badaniu modelowym nie wykazano powstania biofilmu w temperaturze 4 °C i 62,5 °C, jednak większość izolatów wykazywała wzrost w temperaturze 62,5 °C do 8h inkubacji. Wydaje się, że temperatura 4 °C może być zbyt niska do wzrostu bakterii i rozwoju biofilmu, a temperatura 62,5 °C zbyt wysoka do tworzenia biofilmu. Potwierdzają to badania Fakruddin'a i wsp. (2014), którzy wykazali, że wartość D_{62} dla izolatów *C. sakazakii* mieściła się w przedziale od 0,57 do 1,12 min. Morgan i wsp. (1988) ustalili przewidywaną wartość D_{60} dla izolatów *K. pneumoniae* na 0,022 min. Inaktywacja 90% populacji w temperaturze 62,5 °C w czasie krótszym niż 1,5 min uniemożliwiła utworzenie biofilmu przez badane izolaty.

W badaniach własnych tworzenie biofilmu na powierzchni polistyrenu zaobserwowano w temperaturze 25 °C od 12 h inkubacji (dla bakterii: *C. sakazakii* ATCC 29544; *Klebsiella* spp. 1, 3, 5; *Bacillus* spp.; *E. hormaechei* 1, 2; *E. cloacae* 1), a w 37 °C wszystkie badane bakterie tworzyły biofilm od 8 h inkubacji. Można zatem wnioskować, że im wyższa temperatura tym zdolność tworzenia biofilmu i intensywność tworzonego biofilmu wzrasta. Porównanie tych wyników z

publikacjami innych autorów, dotyczącymi tworzenia biofilmu przez *Salmonella* spp., nie jest jednoznaczne. Na przykład w badaniach Piras i wsp. 2015, w przypadku szczepów *S. enterica* wykazano, że wykazywały większą zdolność tworzenia biofilmu w temperaturze niższej, czyli w 22 °C niż w 35 °C. Podobnie w badaniu Stepanović i wsp. (2003) zaobserwowano wyższą produkcję biofilmu *Salmonella* spp. w 30 °C i w 22 °C niż w 37 °C. W przytoczonych badaniach biofilm powstawał intensywniej w temperaturach niższych niż 37 °C.

W badaniu własnym szczep *S. enterica* sv. Typhimurium nie tworzył biofilmu na powierzchni polistyrenu w 25 °C, tylko w 37 °C. Z kolei Buzoleva i wsp. (2018) wykazali, że *Pantoea* spp. wytwarza silniejszy biofilm w 37 °C niż w 22 °C. Podobnie w badaniu własnym, gdzie *Pantoea* spp. tworzyła biofilm tylko w 37 °C, a w 25 °C biofilm nie powstawał. W badaniu Korres i wsp. (2013) wykazano, że *K. pneumoniae* tworzy silniejszy biofilm w 40 °C niż w 35 °C. W badaniu własnym w temperaturze 37 °C szczepy *Klebsiella* tworzyły więcej biofilmu i był on dużo bardziej intensywny niż w temperaturze 25 °C. Hošťacká i wsp. (2010) porównali produkcję biofilmu szczepów *K. pneumoniae* w 30 °C i 37 °C. W 37 °C dwa szczepy wykazywały obniżenie produkcji biofilmu, z kolei trzy szczepy w 37 °C produkowały więcej biofilmu. Może to świadczyć o indywidualnych cechach szczepów, które mogą istotnie wpływać na wytwarzanie biofilmu. W badaniu własnym zauważono, że izolaty, które nie produkowały biofilmu (*Pantoea* spp., *S. enterica* sv. Typhimurium i *E. cloacae* 1) lub produkowały słaby biofilm (*Klebsiella* spp. 2) w temperaturze 25 °C, produkowały go również słabiej w temperaturze 37 °C, co może świadczyć o braku przystosowania do przylegania i tworzenia biofilmu.

W badaniu Nyenje i wsp. (2013) wykazano, że *E. cloacae* łatwo tworzą biofilm na plastikowych powierzchniach. W badaniu własnym na powierzchni polistyrenu, w temperaturze 37 °C bakterie wytwarzały silniejszy biofilm po 24 i 48 godzinach inkubacji. Stwierdzono wówczas, że długi czas inkubacji i wysoka temperatura wpływają na powstawanie biofilmu. Iversen i wsp. (2004) wykazali, że wyższa temperatura może sprzyjać tworzeniu się biofilmu, co również zaobserwowano w badaniu własnym, gdzie większość szczepów produkowało więcej biofilmu w wyższej temperaturze (37 °C).

Różnice w zdolności tworzenia biofilmu w zależności od czynników środowiskowych zostały opisane w licznych badaniach. Kwon i wsp. (2017) wykazali,

że w temperaturze 30 °C wydłużenie czasu inkubacji z 24 do 48 godzin zwiększa produkcję biofilmu. Hayrapetyan i wsp., (2015) wykazali, że szczepy *B. cereus* wytwarzają więcej biofilmu po 24 godzinach inkubacji, niż po 48 godzinach. W badaniu własnym *Bacillus* spp. tworzył silny biofilm zarówno po 24 godzinach, jak i po 48 godzinach inkubacji, w temperaturze 37 °C. *C. sakazakii* ATCC 29544 w badaniu własnym nie tworzył silnego biofilmu w temperaturze 25 i 37 °C. Ponadto długość czasu inkubacji nie miała wpływu na tworzenie biofilmu *C. sakazakii* ATCC 29544. Podobne wyniki uzyskali Ye i wsp., (2015), gdzie *C. sakazakii* tworzył jedynie słaby biofilm w temperaturze 37 °C.

Na podstawie badania własnego i wniosków przytoczonych badań, można zauważyć zmienność tworzenia biofilmu w różnych warunkach środowiskowych. W przypadku niektórych szczepów obniżenie temperatury inkubacji może zmniejszyć wzrost bakterii, ale promować tworzenie biofilmu. Wyizolowane w badaniu własnym drobnoustroje mają tendencję do tworzenia biofilmu, na powierzchni polistyrenu w temperaturze 25 i 37 °C. Zdolność tworzenia biofilmu zależy również od koncentracji inokulum, im wyższe tym zdolność tworzenia biofilmu wzrasta. Czas jest czynnikiem mającym wpływ na rozwój biofilmu, jednakże nie można określić optymalnego czasu, w którym bakterie tworzą biofilm. Należy podkreślić, że wszystkie czynniki środowiskowe są od siebie zależne, również cechy gatunkowe szczepów wpływają na produkcję biofilmu w różnych, zmiennych warunkach środowiskowych. Przeprowadzona w badaniu własnym analiza PCA wykazała, że w temperaturze 25 °C tworzenie biofilmu determinowane jest głównie przez temperaturę, a czynnikiem decydującym o tworzeniu biofilmu w temperaturze 37 °C jest czas.

Czynnikiem istotnie wpływającym na tworzenie biofilmu może być rodzaj powierzchni. Rurki enteralne wykonane są z medycznego polichlorku winylu (PVC). W badaniu Hurrell i wsp. (2009) wykazano, iż zdolność adhezji do rurek wykonanych z PVC wykazują bakterie: *Pantoea* spp., *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. cloacae*, *E. hormachei*, *C. sakazakii*. Powierdzono to również w badaniu własnym, gdzie oceniono zdolność tworzenia biofilmu przez *C. sakazakii* ATCC 29544, *Bacillus* spp. i *E. cloacae* na powierzchni PVC. Rozwój biofilmu na rurkach do żywienia enteralnego może stanowić czynnik ryzyka dla zdrowia noworodka. Rurki te są używane do karmienia noworodków z niską masą urodzeniową na oddziałach intensywnej terapii. Ze względu na niedojrzały układ immunologiczny, zwiększoną przepuszczalność

błony śluzowej jelita i dysbiozę mikroflory jelitowej, niemowlęta mogą być podatne na infekcje w wyniku kolonizacji przez bakterie rurek enteralnych. Należy podkreślić, że wzrost mikroorganizmów następuje szybciej w środowiskach bogatych w składniki odżywcze, a mleko kobiece jest pokarmem bogatym w składniki odżywcze.

Tworzenie się biofilmu na powierzchni rurki enteralnej koreluje z czasem umieszczenia rurki w organizmie. W badaniu Misra i wsp. (2022) oceniano zdolność produkowania biofilmu przez *E. cloacae*, na rurkach do żywienia enteralnego w zakresie czasowym 24, 48, 72, 96 i 120 godzin w 37°C. Badacze zaobserwowali intensywną produkcję biofilmu od 24 godzin inkubacji z tendencją wzrostową do 96 godzin. W badaniu własnym próby inkubowano do 36 godzin i obserwowano biofilm *E. cloacae* w każdym badanym zakresie czasowym, z wyjątkiem 3 i 30 godziny inkubacji. W 36 h *E. cloacae* tworzył biofilm słaby i umiarkowany. W badaniach Misra i wsp. (2022) wykazano, że w czasie 24-72 h dochodzi do wzrostu i progresji tworzenia biofilmu *E. cloacae*. W przedziale czasowym 96-120 h wykazano nieznaczne zmniejszenie intensywności tworzenia biofilmu, co może korelować z przejściem z fazy dojrzewania do fazy dyspersji biofilmu (Misra i wsp., 2022). W badaniach własnych *E. cloacae* wykazywał intensywną produkcję biofilmu na rurkach enteralnych. Podobne wyniki otrzymali Sabir i wsp. (2017). *E. cloacae* to jeden z najczęściej izolowanych patogenów szpitalnych. Wywołuje infekcje oportunistyczne, kolonizuje sprzęt medyczny i tworzy na nich biofilm (Misra i wsp., 2022), co również potwierdzono w badaniach własnych.

W badaniu własnym biofilm *C. sakazakii* ATCC 29544 na rurce enteralnej obserwowano w 12 i 24 godzinie inkubacji, natomiast w badaniu Hurrell i wsp. (2009) *C. sakazakii* produkował biofilm już od 2 h. Wynik ten wskazuje, że tworzenie biofilmu w dużej mierze zależy od indywidualnych cech szczepów (Misra i wsp., 2022). Chociaż badania dotyczące określenia optymalnego czasu umieszczenia rurki enteralnej w organizmie noworodka są ograniczone, to w literaturze naukowej podkreśla się, że czas umieszczenia rurki w organizmie poniżej 12 h może ograniczyć wzrost bakterii i zmniejszyć tworzenie biofilmu. Jednakże ze względu na obciążenie pracą personelu medycznego i dyskomfort noworodka, wymiana rurek w czasie do 12 h nie jest praktykowana (Parker i wsp., 2022), a obecność bakterii przez dłuższy czas, w środowisku bogatym w składniki odżywcze może maksymalizować ryzyko zdrowotne noworodka. W badaniu własnym *C. sakazakii* ATCC 29544 tworzył

biofilm na rurce enteralnej w 12 i 24 godzinie inkubacji. Z kolei *E. cloacae* tworzył biofilm od 6 godziny inkubacji.

Ocenę zdolności tworzenia biofilmu na stali nierdzewnej i polipropylenie przeprowadzano w badaniach własnych, w temperaturach chłodniczych (4 i 12°C) oraz w temperaturze pokojowej (25°C). Temperatury chłodnicze mają kluczowe znaczenie w spowalnianiu wzrostu bakterii, jednakże pomimo tego, mogą one produkować biofilm. Może być to słabszy biofilm i/lub czas tworzenia biofilmu może być wydłużony w porównaniu z temperaturami wyższymi. W badaniu własnym w temperaturze chłodniczej wszystkie szczepy produkowały biofilm (zarówno na powierzchni polipropylenu jak i stali nierdzewnej).

W przypadku *E. cloacae* i *C. sakazakii* ATCC 29544 zauważono różnice w tworzeniu biofilmu w poszczególnych temperaturach. W wyższej temperaturze intensywność tworzenia biofilmu wzrastała. Niska temperatura również sprzyja tworzeniu biofilmu, np. w badaniu własnym, w temperaturze 4 °C biofilm *E. cloacae* i *C. sakazakii* ATCC 29544 obserwowano od 36 godziny inkubacji. Zjawisko to może stanowić istotne ryzyko zdrowotne. Przechowywanie mleka lub mieszanki mlekozastępczej w butelce, w temperaturze chłodniczej może przyczynić się do wystąpienia biofilmu na powierzchni materiału.

Niezwykle ważne jest przewidywanie wpływu różnych czynników środowiskowych na rozwój biofilmu. Pomóc w tym może modelowanie matematyczne (mikrobiologia prognostyczna). Mikrobiologia prognostyczna jako subdyscyplina mikrobiologii żywności zajmuje się opracowaniem modeli matematycznych, które charakteryzują reakcję drobnoustrojów na określone warunki środowiska oraz weryfikacją ich zastosowania do przewidywania wzrostu, przeżywalności i inaktywacji mikroorganizmów w żywności. Założeniem mikrobiologii prognostycznej jest zasada, że reakcja grupy mikroorganizmów w określonych warunkach jest powtarzalna. Głównym celem prognozowania w mikrobiologii żywności jest obniżenie pracochłonności i czasochłonności badań laboratoryjnych, mających na celu ocenę bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności. Klasyczne metody analiz mikrobiologicznych wykonywane na szeroką skalę, wiążą się ze znacznym zwiększeniem kosztów i wydłużeniem czasu niezbędnego do otrzymania wyników umożliwiającich oszacowanie ryzyka

mikrobiologicznego (Rosiak i Kołożyn-Krajewska, 2003; Kowalik i wsp., 2009; Lasik i wsp., 2016; Rosiak i wsp., 2018).

Dalszy rozwój mikrobiologii prognostycznej może przyczynić się do zrozumienia roli różnych warunków środowiskowych w tworzeniu biofilmu. Proces powstawania biofilmu przez różne drobnoustroje jest złożony. Do charakterystyki zagrożeń mikrobiologicznych mogą być wykorzystane matematyczne modele prognostyczne, umożliwiające opis powstawania biofilmu i ocenę ryzyka zakażeń mikrobiologicznych. Należy podkreślić, że w dostępnej literaturze, nie znaleziono modeli prognostycznych dotyczących tworzenia biofilmu przez bakterie patogenne wyizolowane z mleka kobiecego, a matematycznych modeli opisujących tworzenie biofilmów bakteryjnych jest bardzo niewiele.

W niniejszej pracy opracowano modele powierzchni odpowiedzi obrazujące powstawanie biofilmu w zależności od czasu i gęstości inokulum. Modele powierzchni odpowiedzi to modele empiryczne, opisujące odpowiedź populacji drobnoustrojów na czynniki środowiskowe. Dopasowanie zależności matematycznych do przebiegu danych empirycznych stanowi jedno z kryteriów oceny modelu (Rosiak i wsp., 2018). Przedstawione w pracy modele opracowano wykorzystując nieliniowe funkcje z rodziny Gaussian, Extreme Value, Log Normal i Logistic Peak.

W dostępnej literaturze znaleziono kilka prac dotyczących modeli prognostycznych wytwarzania biofilmów bakteryjnych. Na przykład Tango i wsp. (2018) opracowali model predykcyjny zdolności produkowania biofilmu przez *Staphylococcus aureus* w zależności od pH, aktywności wody i stężenia etanolu. Do opracowania modeli badacze wykorzystali wartości kardynalne czynników środowiskowych (minimalne, optymalne i maksymalne). Modele parametrów kardynalnych do opracowania modelu wykorzystali również Dimakopoulou-Papazoglou i wsp. (2016), którzy przedstawili model zdolności tworzenia biofilmu przez *Salmonella enterica* ser. Newport w zależności od pH i aktywności wody. Hu i wsp. (2022) opracowali z wykorzystaniem regresji logistycznej modele prawdopodobieństwa adhezji i tworzenia biofilmu przez *Listeria monocytogenes*. Moraes i wsp. (2018), wykorzystując model regresji logistycznej drugiego rzędu, opracowali model granic adhezji i tworzenia biofilmu przez *S. enterica* na powierzchni stali nierdzewnej.

Opracowane w badaniu własnym matematyczne modele charakteryzują się wartościami współczynnika R^2 , świadczącym o dobrym dopasowaniu modelu do danych, na poziomie 0,707 – 0,912 (Tabela 6, publikacja P3). Modele opracowane dla *C. sakazakii* ATCC 29544 i *E. cloacae* dla powierzchni PVC i stal nierdzewna charakteryzowały się wartościami R^2 wynoszącymi odpowiednio: 0,756 i 0,707 oraz 0,723 i 0,864. W przypadku powierzchni polipropylenu uzyskane modele charakteryzowały się bardzo dobrymi wartościami współczynnika R^2 , wynoszącymi 0,850-0,912. Najlepiej dopasowane modele otrzymano dla powierzchni stali nierdzewnej i polipropylenu.

Opracowane modele w większości przypadków potwierdziły wpływ czynników uwzględnionych w doświadczeniu jako determinujących powstawanie biofilmu. Dlatego można uznać je za użyteczne narzędzie do oceny wpływu różnych czynników na złożone zjawisko tworzenia biofilmu. Ryzyko tworzenia się biofilmu, w dużym stopniu zależy od gęstości inokulum, ma ona kluczowe znaczenie, ponieważ liczba mikroorganizmów w biofilmie będzie decydowała o poziomie zanieczyszczenia żywności. Ryzyko tworzenia biofilmu może również zależeć od czynników stresogennych dla drobnoustrojów. Czynnikiem stresogennym dla drobnoustrojów może być dezynfekcja. Tango i wsp. (2018) w swojej publikacji wskazali, że użycie do dezynfekcji zbyt niskiego stężenia etanolu może wywołać stres środowiskowy drobnoustrojów, zwiększając tym samym potencjalne ryzyko tworzenia biofilmu. Dlatego w celu zapobiegania tworzeniu biofilmu należy używać płynów o odpowiednio wysokim stężeniu substancji czynnej.

Z uwagi na doniesienia o ryzyku zanieczyszczenia mleka kobiecego i występowaniu zakażeń wywołanych *C. sakazakii* i *E. cloacae* wśród noworodków oraz zdolności tworzenia przez te bakterie biofilmu (Haston i wsp., 2023; Lachowska i wsp., 2021), otrzymane w wyniku toku badań modele mogą stanowić narzędzie w ocenie ryzyka mikrobiologicznego w bankach mleka kobiecego, oddziałach neonatologicznych, oddziałach intensywnej terapii dla noworodków.

6. Stwierdzenia i wnioski

1. W wyniku przeprowadzonego przeglądu literatury stwierdzono, że gatunki *Cronobacter* spp. powszechnie występują w środowisku naturalnym, a także w mleku kobiecym i w związku z tym mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia wcześniaków i niemowląt z niską masą urodzeniową, szczególnie z powodu tworzenia biofilmu na powierzchniach stali nierdzewnej, szkła, silikonu, poliwęglanu i plastiku.
2. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że czynnikami odpowiedzialnymi za tworzenie biofilmu na powierzchni polistyrenu przez bakterie *C. sakazakii* ATCC 29544 oraz izolowane z mleka kobiecego bakterie *Klebsiella* spp., *Bacillus* spp., *Pantoea* spp., *S. enterica* sv. Typhimurium, *E. cloacae*, *E. hormaechei*, były temperatura 25 °C i czas.
3. Przeprowadzone badanie z udziałem dwóch wybranych bakterii (*C. sakazakii* ATCC 29544 i *E. cloacae*) wskazało na tworzenie przez te bakterie biofilmu na powierzchniach PVC, polipropylenu i stali nierdzewnej. Zjawisko tworzenia biofilmu zależało od temperatury, czasu, gęstości inokulum.
4. Prognozowana zdolność tworzenia biofilmu w temperaturze 37 °C, przy najwyższym badanym poziomie inokulum, w przypadku *C. sakazakii* ATCC 29544 i *E. cloacae* na powierzchni medycznego PVC (rurki enteralne), miała miejsce w czasie 10-20 h, co może stanowić poważne ryzyko dla zdrowia noworodków.
5. Prognozowana, na podstawie skonstruowanych modeli, zdolność tworzenia biofilmu, przy najwyższym badanym poziomie inokulum, w temperaturze 4 °C, na powierzchni polipropylenu (butelka do przechowywania mleka) i stali nierdzewnej (powierzchnie robocze,) zachodziła w przypadku *C. sakazakii* ATCC 29544 w czasie 30-40 h (polipropylen) i 40-50 h (stal nierdzewna). W przypadku *E. cloacae* prognozowany czas tworzenia biofilmu na obu powierzchniach wynosił 30-40 h.
6. Skonstruowane matematyczne modele prognostyczne charakteryzują się wartościami współczynnika determinacji R^2 , świadczącym o dobrym i bardzo dobrym dopasowaniu modelu do danych empirycznych w zakresie 0,707-

0,912. Najlepiej dopasowane modele otrzymano dla powierzchni stali nierdzewnej i polipropylenu.

Wnioski końcowe

1. Na podstawie przeprowadzonych badań potwierdzono hipotezę, że bakterie patogenne przenoszone ze środowiska przez mleko kobiece tworzą biofilm na powierzchniach stosowanych w bankach mleka, stanowiąc poważne zagrożenie mikrobiologiczne dla noworodków.
2. Biorąc pod uwagę współczynnik determinacji R^2 , można potwierdzić hipotezę drugą stanowiącą, że prognostyczne modele powstawania biofilmu bakterii *Cronobacter sakazakii* ATCC 25944 i *Enterobacter cloacae* na powierzchniach roboczych będą przydatnym narzędziem w ocenie i zarządzaniu ryzykiem powstawania biofilmu, w placówkach odpowiedzialnych za jakość mikrobiologiczną mleka kobiecego.

7. Spis piśmiennictwa

1. Adjidé C. C., Leke A., Mullie C. *Bacillus cereus* contamination of pasteurized human milk donations: Frequency, origin, seasonal distribution, molecular typing of strains and proposed corrective/preventive actions. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 2020, s. 1-8.
2. Buzoleva L.S., Golozubova Y.S., Eskova A.I., Kim A.V., Bogatyrenko E.A., Biofilm formation as a method of survival of *Escherichia coli* and *Pantoea* spp. in the marine environment. *IOP Environmental Research* 2018, 107, s. 1-6.
3. Cormontagne D., Rigourd V., Vidic J., Rizzotto F., Bille E., Ramarao N., *Bacillus cereus* induces severe infections in preterm neonates: implication at the hospital and human milk bank level. *Toxins* 2021, 13, 1-26.
4. Dancer G. I., Mah J. H., Rhee M. S., Hwang I. G., Kang D. H., Resistance of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) to environmental stresses. *Journal of Applied Microbiology* 2009, 107, s. 1606–1614.
5. Decousser J. W., Ramaro N., Duport C., Dorval M., Bourgeois- Nicolaos N., Guinebretiere M. H., Razafimahefa H., Doucet- Populaire F., *Bacillus cereus* and severe intestinal infections in preterm neonates: Putative role of pooled breast milk, *American Journal of Infection Control* 2013, 41, s. 918-921.
6. Dimakopoulou-Papazoglou D., Lianou A., Koutsoumanis K. P., Modelling biofilm formation of *Salmonella enterica* ser. Newport as a function of pH and water activity. *Food Microbiology* 2016, 53, s. 76-81.
7. Fakruddin M., Rahaman M., Ahmed M.M., Hoque M.M., Stress tolerant virulent strains of *Cronobacter sakazakii* from food. *Biology Research* 2014, 47, s. 1-12.
8. Farmer J., Asbury M., Hickman F., Brenner D.: *Enterobacter sakazakii*, new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology* 1980, 86, s. 221–225.
9. Gad S., Sheta M. M., Al-Khalafawi A. I., Abu El-Fadl H. A., Anany M., Sahmoud S., Amin, M. K., Expressed Breast Milk Contamination in

- Neonatal Intensive Care Unit. *Pediatric Health, Medicine and Therapeutics*, 2021, 12, s. 307-313.
10. Garbowska M., Berthold-Pluta A., Stasiak-Róžańska L., Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter* spp. *Food Microbiology* 2015, 49, s. 1–5.
 11. Gupta T. B., Mowat E., Brightwell G., Flint S.H., Biofilm formation and genetic characterization of New Zealand *Cronobacter* isolates, *Journal of Food Safety* 2017, 38, s. 1-13.
 12. Haston J. C., Miko S., Cope J. R., McKeel H., Walters C., Joseph L. A., Griswold T., Katz L. S., Andújar A. A., Tourdot L., Rounds J., Vagnone P., Medus C., Harris J., Geist R., Neises D., Wiggington A., Smith T., Im M. S., Wheeler C., Smith P., Carleton H. A., Lee C. C., *Cronobacter sakazakii* Infections in Two Infants Linked to Powdered Infant Formula and Breast Pump Equipment—United States, 2021 and 2022. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2023, 72, s. 223-226.
 13. Hayrapetyan H., Abee T., Groot M.N., Sporulation dynamics and spore heat resistance in wet and dry biofilms of *Bacillus cereus*. *Food Control* 2016, 60, s. 493-499.
 14. Hošťacká A., Čižnár I., Štefkovičová M., Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. *Folia Microbiologica* 2010, 55, s. 75–78.
 15. Hu L., Dong Q., Li Z., Ma Y., Aslam M. Z., Liu Y., Modelling the Adhesion and Biofilm Formation Boundary of *Listeria monocytogenes* ST9. *Foods* 2022, 11, s. 19-40.
 16. Hu L., Dong Q., Li Z., Ma Y., Aslam M. Z., Liu, Y., Modelling the Adhesion and Biofilm Formation Boundary of *Listeria monocytogenes* ST9. *Foods* 2022, 11, s. 1-11.
 17. Hu L., Grim C. J., Franco A. A., Jarvis K. G., Sathyamoorthy V., Kothary M.H., Tall B. D., Analysis of the cellulose synthase operon genes, *bcsA*, *bcsB*, and *bcsC* in *Cronobacter* species: Prevalence among species and their roles in biofilm formation and cell-cell aggregation. *Food Microbiology* 2015, 52, s. 97–105.
 18. Hurrell E., Kucerova E., Loughlin M., Caubilla-Barron J., Hilton A., Armstrong R., Smith C., Grant J., Shoo S., Forsythe S., Neonatal enteral

- feeding tubes as loci for colonisation by members of the *Enterobacteriaceae*. BMC Infectious Diseases 2009, 9, s. 1-9.
19. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
 20. Iversen C., Lane M., Forsythe S. J., Growth profile, thermotolerance, and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* cultured in infant formula. Latvian Society for Microbiology 2004, 38, 378–382.
 21. Iversen C., Lehner A., Mullane N., Bidlas E., Cleenwerck I., Marugg J., Fanning S., Stephan R., Joosten H., The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecie*. BMC Evolutionary Biology 2007, 7, s. 1–11.
 22. Jandová M., Měřička P., Fišerová M., Landfeld A., Paterová P., Hobzová L., Jarkovská E., Kacerovsky M., Houška M., *Bacillus cereus* as a major cause of discarded pasteurized human banked milk: a single human milk bank experience. Foods 2021, 10, s. 1-15.
 23. Jiménez E., Arroyo R., Cárdenas N., Marín M., Serrano P., Fernández L., Rodríguez J.M., Mammary candidiasis: A medical condition without scientific evidence? PLoS ONE 2017, 12, s. 1-25.
 24. Kim S., Kim Y. T., Yoon H., Lee J. H., Ryu S., The complete genome sequence of *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 T, a goodborne pathogen, isolated from a child's throat. Gut Pathogens 2017, 9, s. 1–7.
 25. Korres A.M.N., Aquije G.M.D.F.V., Buss D.S., Ventura J.A., Fernandes P.M.B., Fernandes A.A.R., Comparison of biofilm and attachment mechanisms of a phytopathological and clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*. The Scientific World Journal 2013, 10, s. 1–7.

26. Kowalik J., Łobacz A., Tarczyńska A. S., Ziajka S. Zastosowanie mikrobiologicznych modeli prognostycznych w produkcji bezpiecznej żywności. *Medycyna Weterynaryjna* 2009, 65, 381-384.
27. Kwon M., Hussain M.S., Oh D.H., *Bacillus cereus* biofilm formation under food processing conditions. *The Science of Food. Biotechnology* 2017, 26, s. 1103–1111
28. Kowalik A., Szablewski T., Cegielska-Radziejewska R., Tomczyk Ł., Zabielski J., Zastosowanie mikrobiologii prognostycznej do oceny bezpieczeństwa żywności. *Bezpieczeństwo żywności w łańcuchu żywnościowym* 2016, s. 41-47
29. Lee Y. D., Park J. H., Chang H., Detection, antibiotic susceptibility and biofilm formation of *Cronobacter* spp. from various foods in Korea. *Food Control* 2012, 24, s. 225–230.
30. Li Y., Chen Q., Zhao J., Jiang H., Lu F., Bie X., Lu Z.: Isolation, identification and antimicrobial resistance of *Cronobacter* spp. isolated from various foods in China. *Food Control* 2014, 37, s. 109–114.
31. Malinowska-Pańczyk E.: Can high hydrostatic pressure processing be the best way to preserve human milk?. *Trends in Food Science & Technology* 2020, 101, s. 133-138.
32. Malinowska- Pańczyk E.: Jakość mikrobiologiczna mleka kobiecego z banku mleka. [w:] Wesołowska A. (red.): *Banki Mleka w Polsce. Funkcjonownie w podmiotach leczniczych- idea i praktyka*. Fundacja Bank Mleka Kobiecego, Warszawa 2017, s. 146-148.
33. Misra T., Tare M., Jha P. N., Insights into the dynamics and composition of biofilm formed by environmental isolate of *Enterobacter cloacae*. *Frontiers in Microbiology* 2022, 5, s. 22-40.
34. Moraes J. O., Cruz E. A., Souza E. G., Oliveira T. C., Alvarenga V. O., Peña W. E., Sant’Ana A.S., Magnani, M., Predicting adhesion and biofilm formation boundaries on stainless steel surfaces by five *Salmonella enterica* strains belonging to different serovars as a function of pH, temperature and NaCl concentration. *International Journal of Food Microbiology* 2018, 281, s. 90-100.

35. Morgan J.N., Lin F.J., Eitenmiller R.R., Barnhart H.M., Toledo R.T., Thermal destruction of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in human milk. *Journal Food Protection* 1988, 51, s. 132–136.
36. Mshana S. E., Gerwing L., Minde M., Hain T., Domann E., Lyamuya E., Chakraborty T., Imirzalioglu C., Outbreak of a novel *Enterobacter* sp. carrying blaCTX-M-15 in a neonatal unit of a tertiary care hospital in Tanzania. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2011, 38, s. 265-269.
37. Nyenje M.E., Green E., Ndip R.N., Evaluation of the effect of different growth media and temperature on the suitability of biofilm formation by *Enterobacter cloacae* strains isolated from food samples in South Africa. *Molecules* 2013, 18, s. 9582–9593.
38. Parker L. A., Magalhães M., Desorcy-Scherer K., Torrez Lamberti M., Lorca G. L., Neu J., Neonatal feeding tube colonization and the potential effect on infant health: a review. *Frontiers in nutrition* 2022, 9, s. 1-9.
39. Pawlik D., Chmierzarczyk A., Lorenc K., Michalski P., Lauterbach J., Radziszewska R., Wójkowska-Mach J., *Klebsiella pneumoniae* in breast milk – a cause sepsis in neonate. *Archives of Medicine* 2017, 9, s. 1-6.
40. Pei X., Li Y., Zhang H., Zhan L., Yu X., Lan G., Jia H., Li N., Yang D., Mei L., Surveillance and characterization of *Cronobacter* in powdered infant formula processing factories. *Food Control* 2019, 96, s. 318–323.
41. Piras F., Fois F., Consolati S. G., Mazza R., Mazzette R., Influence of temperature, source, and serotype on biofilm formation of *Salmonella enterica* isolates from pig slaughterhouses, *Journal of Food Protection* 2015, 78, 1875-1878.
42. Rigourd V., Barnier J. P., Ferroni A., Nicloux M., Hachem T., Magny J. F., Lapillonne A., Frange P., Nassif X., Bille E., Recent actuality about *Bacillus cereus* and human milk bank: a new sensitive method for microbiological analysis of pasteurized milk. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2018, 37, s. 1297-1303.
43. Rosiak E., Kajak-Siemaszko K., Trzaskowska M., Kołożyn-Krajewska D., Prognozowanie w mikrobiologii żywności. *Postępy mikrobiologii* 2018, 3, s. 227-241.

44. Rosiak E., Kołożyn - Krajewska D., Zastosowanie metod prognozowania mikrobiologicznego do określania rozwoju mikroflory saprofitycznej w produktach mięsnych utrwalonych lizozymem w formie monomeru. *Żywność: Nauka, Technologia, Jakość* 2003, 3, s. 36-46.
45. Rozporządzenie Komisji (WE) NR 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych.
46. Sabir N., Ikram A., Zaman G., Satti L., Gardezi A., Ahmed A., Ahmed P., Bacterial biofilm-based catheter-associated urinary tract infections: Causative pathogens and antibiotic resistance. *American Journal of Infection Control* 2017, 45, s. 1101-1105.
47. Sosnowski M., Czubkowska A., Korpysa-Dzirba W., Ostrowska M., Rola J., Osek J. *Cronobacter sakazakii* – charakterystyka i znaczenie w mikrobiologii żywności. *Medycyna Weterynaryjna* 2010, 70, s. 669–672.
48. Stepanović S., Ćirković I., Mijač V., Švabić-Vlahović M., Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiology* 2003, 20, s. 339-343.
49. Strom K., Jarzynka S., Minkiewicz-Zochniak A., Barbarska O., Olędzka G., Wesolowska A., Microbiological Quality of Milk Donated to the Regional Human Milk Bank in Warsaw in the First Four Years of Activity. *Healthcare* 2022, 10, s. 1-11.
50. Tango C. N., Akkermans S., Hussain M. S., Khan I., Van Impe J., Jin Y. G., Oh D. H., Modeling the effect of pH, water activity, and ethanol concentration on biofilm formation of *Staphylococcus aureus*, *Food microbiology* 2018, 76, s. 287-295.
51. Weems M. F., Dereddy N. R., Arnold S. R., Mother's Milk as a Source of *Enterobacter cloacae* Sepsis in a Preterm Infant, *Breastfeeding Medicine* 2015, 10, s. 503-504.
52. Ye Y., Ling N., Jiao R., Wu Q., Han Y., Gao J., Effects of culture conditions on the biofilm formation of *Cronobacter sakazakii* strains and distribution of genes involved in biofilm formation. *LWT-Food Science Technology* 2015, 62, 1–6.

53. Zhou X., Gao J., Huang Y., Fu S., Chen H., Antibiotic resistance pattern of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter sakazakii* isolates from powdered infant formula. African Journal of Microbiology Research 2011, 5, s. 3073–3077.

8. Publikacje stanowiące rozprawę doktorską

CRONOBACTER SPP. – POWAŻNE ZAGROŻENIE W ŻYWNOŚCI DLA NIEMOWLĄT

Mateusz Gemba, Elżbieta Rosiak*, Danuta Kołożyn-Krajewska

Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wpłynęło w listopadzie 2019 r., zaakceptowano w kwietniu 2020 r.

Streszczenie: *Cronobacter* spp. uznawane są za oportunistyczne patogeny we wszystkich grupach wiekowych, szczególnie u wcześniaków, niemowląt z niską masą urodzeniową, osób w wieku podeszłym i osób z obniżoną odpornością. Obecnie rodzaj *Cronobacter* obejmuje siedem gatunków: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjesii*, *C. universalis*, *C. dublinensis* i *C. condimenti*. Trzy pierwsze gatunki *Cronobacter* zostały skojarzone z infekcjami klinicznymi noworodków i wcześniaków. Zakażenia bakteriami *Cronobacter* mogą powodować zapalenie komórek nerwowych, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, tworzyć ropnie i torbiele mózgu prowadzące do wodogłowia oraz martwicze zapalenie jelit. Chociaż zakażenia wywołane przez *Cronobacter* spp. są rzadkie to współczynnik śmiertelności jest bardzo wysoki, jak również koszty związane z długoterminowym leczeniem powikłań po infekcji. *Cronobacter* spp. dzięki produkcji otoczek i biofilmu, termotolerancyjności jest odporny na wysuszenie i wykazuje przeżywalność w mieszankach mlekozastępczych i innych produktach o niskiej aktywności wody. *Cronobacter* spp. izolowano z warzyw, zbóż, płatków, ziemniaków, przypraw, mięsa, ryb, sera, tofu, ryżu, makaronu, czekolady, herbaty oraz z powierzchni abiotycznych w środowisku szpitalnym, z przedmiotów i sprzętu medycznego. Na podstawie Rozporządzenia (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005, z późniejszymi zmianami, *Cronobacter* spp. powinien być nieobecny w trzydziestu 10 g próbkach preparatów w proszku do początkowego żywienia niemowląt i żywności dietetycznej w proszku specjalnego przeznaczenia medycznego, przeznaczonego dla niemowląt w wieku do 6 miesięcy. W pracy podjęto temat oceny występowania zagrożenia powodowanego przez bakterie *Cronobacter* w żywności w świetle obowiązujących wymagań.

1. Wprowadzenie. 2. Objawy i chorobotwórczość *Cronobacter* spp. 3. Wymagania przepisów prawa. 4. Mechanizmy wirulencji *Cronobacter* spp. 5. Taksonomia *Cronobacter* spp. 6. Występowanie *Cronobacter* spp. w żywności. 7. Oporność *Cronobacter* spp. na warunki stresowe. 8. Tworzenie biofilmu przez bakterie z rodzaju *Cronobacter*. 9. Wykrywanie i oznaczanie liczby *Cronobacter* spp. 10. Antybiotykooporność *Cronobacter* spp. 11. Podsumowanie

CRONOBACTER SPP. – THE SERIOUS RISK IN A BABY FOOD

Abstract: *Cronobacter* spp. are considered opportunistic pathogens in all age groups, especially in premature babies, children with low birth weight, the elderly and immunocompromised people. Currently, the genus *Cronobacter* includes seven species: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjesii*, *C. universalis*, *C. dublinensis* and *C. condimenti*. The first three species of *Cronobacter* have been associated with clinical infections of newborns and premature babies. *Cronobacter* bacterial infections can cause neuritis, encephalomyelitis, the formation of abscesses and cysts of the brain leading to hydrocephalus and necrotizing enterocolitis. Often infected with *Cronobacter* spp. are rare, the mortality rate is very high, as well as the costs associated with temporarily treating post-infection complications. *Cronobacter* spp. due to the production of capsule and biofilm, high thermotolerance is resistant to drying and survival loads in milk replacers and other products with water activity. *Cronobacter* spp. isolated from milk replacers used for the initial feeding of infants, with vegetables, cereals, potatoes, spices, meat, fish, cheese, tofu, rice, pasta, chocolate, tea and abiotic surfaces in a hospital, with medical products and equipment. Under the Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005, *Cronobacter* spp. should be absent in thirty 10 g samples of infant formulas and infant dietetic powders intended for infants up to 6 months old. The subject of the study is the assessment of the occurrence the hazard caused by *Cronobacter* in food in the light of applicable requirements.

1. Introduction. 2. Symptoms and pathogenicity *Cronobacter* spp. 3. Legal requirements. 4. Virulence mechanism *Cronobacter* spp. 5. Taxonomy *Cronobacter* spp. 6. Occurrence *Cronobacter* spp. in food. 7. Resistance *Cronobacter* spp. to stress conditions. 8. Biofilm formation by bacteria genus *Cronobacter*. 9. Detection and determination of numbers *Cronobacter* spp. 10. Antibiotic resistance *Cronobacter* spp. 11. Summary

Słowa kluczowe: biofilm, chorobotwórczość, *Cronobacter* spp., wirulencja, wykrywanie

Key words: biofilm, pathogenicity, *Cronobacter* spp., virulence, detection

1. Wprowadzenie

Bakterie *Cronobacter* spp. to Gram-ujemne, względnie beztlenowe, ruchliwe, nieprzetrwalnikujące pałeczki, należące do rodziny *Enterobacteriaceae* [38, 56, 85].

Uznawane są za oportunistyczne patogeny we wszystkich grupach wiekowych, szczególnie u wcześniaków, niemowląt z niską masą urodzeniową, osób w wieku podeszłym i osób z obniżoną odpornością [2, 43, 97]. Nazwa rodzaju *Cronobacter* pochodzi od imienia

* Autor korespondencyjny: Elżbieta Rosiak, Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Wydział Żywnienia Człowieka, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa; tel. 22 59 37 070; e-mail: elzbieta_rosiak@sggw.edu.pl

jednego z greckich tytanów Kronosa, który połykał wszystkie swoje dzieci po urodzeniu. Obecnie rodzaj *Cronobacter* obejmuje siedem gatunków: *C. sakazakii*, *C. malonicus*, *C. turicensis*, *C. muytjesii*, *C. universalis*, *C. dublinensis* i *C. condimenti*. Trzy pierwsze gatunki *Cronobacter* zostały skojarzone z infekcjami klinicznymi noworodków i wcześniaków. *C. dublinensis*, *C. muytjesii* i *C. condimenti* mają prawdopodobnie małe lub znikome znaczenie kliniczne [2, 97].

Bakterie z rodzaju *Cronobacter* spp. zalicza się do patogenów odpowiedzialnych za występowanie na całym świecie rzadkich, ale zagrażających życiu chorób: zapalenia opon mózgowych, bakteriemii, kilku form martwiczego zapalenia jelit [2]. W roku 2002 International Commission for Microbiological Specifications for Food nadała *C. sakazakii* „status zagrożenia, w przypadku wybranych populacji, zagrażającego życiu lub powodującego znaczące przewlekłe, długoterminowe konsekwencje” zaliczając do tej samej kategorii patogenów żywnościowych co *Clostridium botulinum* (typ A i B), *Cryptosporidium parvum* i *Listeria monocytogenes* [2, 3, 38].

W roku 2005 weszło w życie Rozporządzenie Komisji (WE) 2073/2005 (zmienione w 2010 roku Rozporządzeniem (EU) 365/2010) w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych na mocy, którego istnieje obowiązek badania preparatów w proszku dla niemowląt (PIF-powdered infant formula) oraz żywności dietetycznej w proszku specjalnego medycznego przeznaczenia, stosowanej w żywieniu niemowląt do 6 miesiąca życia na obecność *Cronobacter* spp. Według tego Rozporządzenia bakterie *Cronobacter* spp. muszą być nieobecne w trzydziestu 10-gramowych porcjach produktu. Pozytywne na obecność *Cronobacter* spp. partie mieszanek mlekozastępczych powinny zostać wycofane z rynku bez konieczności wykonywania analiz przynależności do gatunku [2, 7, 38].

W pracy podjęto temat oceny występowania zagrożenia powodowanego przez bakterie *Cronobacter* spp. w żywności w świetle obowiązujących wymagań.

2. Objawy i chorobotwórczość *Cronobacter* spp.

Najbardziej narażone na zakażenia wywołane przez bakterie z rodzaju *Cronobacter* są noworodki poniżej 28 dnia życia, noworodki urodzone przedwcześnie, niemowlęta o niskiej masie urodzeniowej (poniżej 2,5 kg) i niemowlęta z upośledzeniem odporności [24, 43, 74]. W USA zgłaszana zapadalność (częstość występowania infekcji wywołanych przez *Cronobacter* na 100 tysięcy niemowląt) wynosi 1, natomiast w przypadku niemowląt z niską masą urodzeniową ryzyko zakażenia wzrasta do 9,4 na 100 tysięcy niemowląt [33].

Po przekroczeniu bariery krew-mózg niektóre gatunki *Cronobacter*, m.in. *C. sakazakii* mogą wywołać

zapalenie komórek nerwowych, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych oraz tworzyć ropnie i torbiele mózgu prowadzące do wodogłowia. Pierwsze przypadki zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych związanych ze spożyciem zakażonych bakterią *C. sakazakii* mieszanek mleko zastępczych opisano w 1961 r. [93]. Wskaźnik śmiertelności niemowląt związany z noworodkowym zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych szacuje się na około 40–80% [18, 38]. W 94% przypadków u niemowląt, które przeżyły ropne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, wywołane zakażeniem *C. sakazakii*, choroba ta pozostawiała nieodwracalne powikłania neurologiczne m.in. wodogłowie, zaburzenia słuchu i wzroku oraz niedowład kończyn [18].

Pierwsze przypadki zakażeń bakterią *C. sakazakii* stwierdzono w Holandii w latach 1977–1981. Doszło wówczas do zakażenia ośmiorga niemowląt bakterią *C. sakazakii*, z których przeżyło dwoje [65]. W Islandii w latach 1986–1987 odnotowano trzy przypadki zakażenia *C. sakazakii*. Jedno z niemowląt nie przeżyło. U drugiego dziecka doszło do znaczącego upośledzenia rozwoju psychicznego i fizycznego. U trzeciego niemowlęcia stwierdzono powikłania w postaci zespołu napadów padaczkowych i opóźnień w rozwoju [9]. W latach 1993–1998 odnotowano 4 przypadki zakażeń niemowląt w Izraelu. Bakterie z gatunku *C. sakazakii* wyizolowano m.in. z miksera używanego do przygotowania mieszanki mlekozastępczej [10]. W okresie od czerwca do lipca 1998 roku doszło do zakażenia dwunastu noworodków w Belgii. Dzieci miały masę urodzeniową < 2000 g i karmione były mieszanką mlekozastępczą. Dwoje noworodków zmarło [94].

Pozostałe, wybrane przypadki infekcji wywołane bakteriami z rodzaju *Cronobacter* spp. przedstawiono w tabeli I. Mimo rosnącej świadomości zagrożenia zachorowania wciąż się zdarzają, potwierdza to m.in. przypadek z 2015 roku z Australii, gdzie w wyniku zakażenia *C. sakazakii* zmarło niemowlę. Bakterię wyizolowano z mleka matki, które było odciągane ręcznym laktatorem. Izolaty bakterii obecne we krwi niemowlaka i w mleku matki były identyczne, co potwierdza, że noworodek był narażony na patogen, poprzez konsumpcję mleka kobiecego (Tab. I) [61]. W 2016 roku w USA zdiagnozowano u noworodka sepsę. Niemowlę karmione było mlekiem kobiecym uzyskanym od dawczyni. Próby pobrane z płynu mózgowo-rdzeniowego i krwi wykazały obecność *C. sakazakii*. Bakterię wyizolowano również z laktatora używanego do odciągania pokarmu kobiecego (Tab. I) [11]. W 2017 roku w Brazylii w wyniku zakażenia *Cronobacter* spp. zmarł noworodek (urodził się w 35 tygodniu ciąży, karmiony był mlekiem matki oraz mieszanką mleko zastępczą). Wyizolowany z krwi *Cronobacter* spp. zidentyfikowano jako *C. sakazakii* ST494 [14]. Zeng i wsp. [101] opisali przypadek zakażenia chłopca bakterią *Cronobacter* spp.

Tabela I
Wybrane infekcje noworodków wywołane przez bakterie *Cronobacter* spp.

Rok	Kraj	Liczba chorych	Objawy/choroba	Skutek infekcji	Piśmien- nictwo
1979	USA	1	Posocznica	Brak danych	[64]
1988	USA	4	Bakteriemia – 2 przypadki, zakażenie dróg moczowych – 1 przypadek, krwawa biegunka – 1 przypadek	Brak danych	[84]
1992	Indie	1	Zapalenie opon mózgowych	Śmierć	[80]
1994	Francja	13	Zapalenie opon mózgowych – 1 przypadek, posocznica – 1 przypadek, martwicze zapalenie jelit – 7 przypadków, brak objawów klinicznych – 4 przypadki	Śmierć – 4 przypadki	[6, 13]
1998	Belgia	12	Martwicze zapalenie jelit	Śmierć – 2 przypadki	[94]
1998	Brazylia	4	Bakteriemia	Brak danych	[22]
1998	Filipiny	12	Zakażenia dróg moczowych, bakteriemia	Brak danych	[22]
1999	USA	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Neurologiczne powikłania	[12]
2000	Izrael	2	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych – 1 przypadek Posocznica – 1 przypadek	Brak danych	[4]
2001	USA	4	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych – 3 przypadki Zakażenia dróg moczowych – 1	Śmierć – 1 przypadek	[22, 31, 86]
2002	Belgia	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Śmierć	[77]
2002	Brazylia	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Śmierć	[5]
2002	Indie	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Śmierć	[80]
2002	USA	5	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych – 3 przypadki Bakteriemia – 2 przypadki	Śmierć – 1 przypadek Powikłania neurologiczne – 2 przypadki	[22]
2003	USA	4	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych – 2 przypadki, Bakteriemia – 2 przypadki	Śmierć – 1 przypadek	[22]
2004	Nowa Zelandia	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych – 1 przypadek	Śmierć – 1 przypadek	[44]
2004	Francja	4	Zapalenie opon mózgowych- 2 przypadki, krwotoczne zapalenie okrężnicy – 1 przypadek, zapalenie spojówek – 1 przypadek	Śmierć – 2 przypadki	[15, 78]
2004	USA	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Powikłania neurologiczne	[22]
2004	Holandia	1	Bakteriemia	Brak danych	[89]
2005	Słowenia	1	Posocznica	Brak danych	[73]
2005	USA	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Powikłania neurologiczne	[22]
2006	Hiszpania	1	Bakteriemia	Brak danych	[1]
2006	Szwajcaria	2	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych – 2 przypadki	Śmierć – 2 przypadki	[60]
2006	USA	2	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych – 2 przypadki	Powikłania neurologiczne	[11, 22]
2007	USA	7	Zapalenie opon mózgowych- 3 przypadki, bakteriemia – 3 przypadki, martwicze zapalenie jelit – 1 przypadek	Śmierć – 1 przypadek Powikłania neurologiczne – 10 przypadków	[22]
2007	Hiszpania	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Brak danych	[79]
2008	Japonia	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Powikłania neurologiczne	[22]
2008	USA	2	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Powikłania neurologiczne – 1 przypadek	[22]
2008	Kanada	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Brak danych	[22]
2008	Korea	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Brak danych	[48]
2010	Meksyk	2	Krwawa biegunka	Brak danych	[41]
2015	Australia	1	Bakteriemia	Śmierć	[61]
2015	Chiny	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Powikłania neurologiczne	[101]
2016	USA	1	Bakteriemia	Brak danych	[11]
2017	Brazylia	1	Ropień mózgu	Śmierć	[14]
2018	USA	1	Bakteriemia	Brak danych	[90]

Źródło: opracowanie własne.

w Chinach. W płynie mózgowo-rdzeniowym wykryto liczne leukocyty, a w mózgu ropnie. Podawano dożylnie antybiotyki: cetazydym, a następnie meropenem. Objawy kliniczne ustąpiły, jednak po 3 tygodniach stwierdzono upośledzony rozwój umysłowy i fizyczny dziecka. Z płynu mózgowo-rdzeniowego wyizolowano *C. sakazakii* ST256 serotyp O1 [101].

3. Wymagania przepisów prawa

Komunikację ryzyka, związanego z występowaniem bakterii *Cronobacter* spp. w żywności dla niemowląt, w Rozporządzeniu (WE) 2073 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych z 15 listopada 2005 poprzedziły spotkania Komitetów Kodeksu Żywnościowego ds. Higieny Żywności (35 sesja w 2003) oraz Żywności i Żywności Specjalnego Dietetycznego Przeznaczenia (24 sesja w 2003). Zadecydowano o rewizji obowiązującego Kodu Praktyk Higienicznych Żywności dla Niemowląt i Dzieci i zwrócono się do FAO i WHO o jak najszybsze zwołanie spotkania ekspertów w sprawie występowania *E. sakazakii* w mieszankach mlekozastępczych (PIF). Spotkanie ekspertów FAO/WHO odbyło się w lutym 2004 roku w Genewie. Poświęcone zostało bezpieczeństwu żywności dla nie-

mowląt i małych dzieci oraz zapobieganiu potencjalnie ciężkim zakażeniom u niemowląt. Patogeny związane z mieszankami mlekozastępczymi, w wyniku przeprowadzonej oceny ryzyka, podzielono na trzy grupy wg ryzyka wystąpienia i skutków zdrowotnych. Pierwsza grupa to kategoria A – wysoki związek przyczynowo skutkowy zakażeń niemowląt w wyniku spożycia mieszanek mlekozastępczych. Do tej kategorii zaliczono *Salmonella* i *Cronobacter* spp. Do kategorii B – związek przyczynowo-skutkowy jest prawdopodobny, ale nie potwierdzony, zaliczono: *Escherichia coli*, *Escherichia vulneris*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Hafnia alvei*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Acinetobacter* spp. Kategoria C – związek przyczynowo-skutkowy mniej prawdopodobny lub jeszcze nie wykazany, to: *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* i *Bacillus cereus*. Opracowano model oceny ryzyka w celu opisanie czynników prowadzących do zakażenia *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) u niemowląt oraz zidentyfikowania potencjalnych strategii ograniczania ryzyka. Opracowany model oceny ryzyka ułatwia także porównanie poziomu zanieczyszczenia produktu w zależności od sposobu przygotowania produktu, obrotu i karmienia. Ponadto zapewnia środki do oceny kryteriów mikrobiologicznych i planu pobierania próbek pod względem

Tabela II
Wybrane geny *Cronobacter* spp.

Gen	Działanie	Piśmien- nictwo
Chorobotwórczość		
cpa	Aktywuje plazminogeny	[16]
sip	Wchodzi w interakcje siderforów	
hly	Wykazuje działanie hemolizujące	
ibeA	Aktywowanie śródbłónka naczyń mózgowych	[51]
ibeB		
yijP		
Wykorzystanie kwasu sjałowego		
nanAKT	Koduje wykorzystanie egzogenego kwasu sjałowego	[47]
Odporność na stres środowiskowy		
curliGR55	Zapewnia odporność komórek bakterii na niską aktywność wody	[26]
Tworzenie biofilmu		
flhE	Synteza rzęski	[27]
mgtB	Koduje czynniki wirulencji	
fliD	Synteza rzęski	
alsS	Koduje podstawowe procesy komórkowe	
flgJ	Synteza rzęski	
cyoD	Koduje podstawowe procesy komórkowe	
ftsK	Odgrywa kluczową rolę w podziałach komórkowych	
bcsC, bcs B, bcs A	Synteza celulozy	

Źródło: opracowanie własne.

redukcji ryzyka i odsetka odrzuconych partii produktów. Model oceny ryzyka szacuje względne ryzyko choroby wywołane przez *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) dla niemowląt z wewnętrznie skażonego PIF, nie bierze pod uwagę zanieczyszczenia i rekontaminacji ze środowiska lub innych źródeł po wytworzeniu. Ponadto opracowano szereg rekomendacji dla krajów członkowskich i organizacji pozarządowych (NGOs) uwzględniających m.in. ustalenie odpowiednich specyfikacji mikrobiologicznych dla *E. sakazakii* w mieszankach mlekozastępczych oraz wskazanie *Enterobacteriaceae* zamiast *E. coli*, jako kryterium oceny higieny środowiska produkcyjnego [22].

Podczas kolejnego spotkania technicznego grupy ekspertów w 2006 roku dokonano oceny opracowanego modelu oceny ryzyka [21]. Wynik tej pracy dostarczył porad i wytycznych zmniejszających ryzyko zakażenia niemowląt w wyniku konsumpcji mleka modyfikowanego w proszku (PIF). Spotkanie ekspertów FAO/WHO w 2008 dotyczyło podjęcia decyzji w sprawie ustanowienia kryterium bezpieczeństwa mikrobiologicznego dla *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) w przypadku mieszanek do żywienia niemowląt powyżej 12 miesiąca życia (FUF – follow-up formula).

Pracę ekspertów FAO/WHO wspierała Komisja Kodeksu Żywnościowego (Codex Alimentarius Commission – (CAC), Komitet ds. Higieny Żywności (Committee on Food Hygiene – CCFH), który jest odpowiedzialny za opracowanie wytycznych zarządzania ryzykiem w obszarze bezpieczeństwa żywności na poziomie międzynarodowym. Ustalenia ze spotkania technicznego z 2006 r. stanowiły wkład w finalizację Kodeksu Praktyk Higienicznych dla Preparatów w Proszku dla Niemowląt i Małych Dzieci (wraz z Aneksami I i III4) (Codex Code of Hygienic Practice for Powdered Formulae for Infants and Young Children).

4. Mechanizmy wirulencji *Cronobacter* spp.

W literaturze opisano dwa podstawowe mechanizmy wirulencji *Cronobacter* spp.: adhezja do komórek nabłonka jelitowego oraz adhezja do komórek śródbłonka naczyń mózgowych [51].

Adhezja bakterii *Cronobacter* spp. do nabłonka jelitowego powoduje zwiększoną apoptozę komórek nabłonka i utratę integralności bariery nabłonkowej [58]. Bakterie *Cronobacter* spp. wykorzystują białka powierzchniowe komórek gospodarza np. fibronektynę, aby przyłączyć się do komórek nabłonkowych jelita oraz mikrofilamenty i mikrotubule do atakowania komórek gospodarza [43]. Przyleganie *Cronobacter* spp. do nabłonka jelitowego wywołuje stan zapalny. Po przekroczeniu bariery jelitowej bakteria może przedostać się do krwioobiegu, powodując sepsę, posocz-

nicę, kilka postaci martwiczego zapalenia jelit, zapalenia migdałków, zapalenia szpiku i kości oraz infekcje dróg moczowych [2, 57, 74].

W warunkach *in vitro* stwierdzono, że białko błony zewnętrznej A komórek (OmpA) odgrywa kluczową rolę w inwazji na komórki nabłonka jelitowego oraz śródbłonka naczyń mózgowych [50]. Przypuszcza się, że *Cronobacter* spp. wnika do komórek nerwowych na zasadzie fagocytozy i zakłóca dojrzewanie komórek dendrytycznych [43]. Uważa się, że geny *ibeA*, *ibeB* i *yijP* *C. sakazakii* odpowiedzialne są za atakowanie śródbłonka naczyń mózgowych [51]. Kim i wsp. [51] wykryli w szczepie *C. sakazakii* ATCC 29544^T gen kodujący OmpA oraz gen *ibeB*.

Chorobotwórczość *Cronobacter* spp. może być związana także z produkcją enterotoksyny, która może wzmacniać wirulencję i translokację przez barierę krew-mózg i jelita [71]. Raghav i Aggarwal [76] określili, masę cząsteczkową toksyny, która wynosi 66 kDa i jest stabilna w 90°C przez 30 min. Oprócz enterotoksyn *Cronobacter* spp. produkuje enzymy proteolityczne, które powodują rozkład komórki gospodarza np. metaloproteaza cynkowa deformuje komórki, prowadząc do ich uszkodzenia [71], *Cronobacter* spp. posiada mechanizm obronny przed układem immunologicznym gospodarza, dzięki tolerancji środowiska makrofagów [43, 91, 92]. Przeżywalność bakterii w makrofagach jest różna w przypadku różnych gatunków *Cronobacter*. Według Townsend i wsp. *Cronobacter* spp. może przetrwać w makrofagach od 48 do 96 godzin [91, 92].

Zidentyfikowano trzy przypuszczalne geny wirulencji *Cronobacter* spp.: *cpa* (aktywator plazminogenu), *sip* (białko wchodzące w interakcje siderforów, czyli nośników jonów żelaza) i *hly* (hemolizyna typu III) [16].

Infekcje wywołane przez *Cronobacter sakazakii* dotyczą określonych typów sekwencji (ST ang. Sequence Type – sekwencje nukleotydowe dla każdego z fragmentów genu są traktowane jako allele, tworząc profil alleliczny, czy typ sekwencji ST dla badanego szczepu) i złożonych kompleksów klonalnych. *C. sakazakii* ST12 powiązany jest z wywołaniem martwiczego zapalenia jelit u noworodków. *C. sakazakii* ST4 i CC4 skojarzono z zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych u noworodków, CC7 *C. malonaticus* z infekcjami dorosłych [17, 97]. Analiza typowania sekwencji multilocus (MLST – Multilocus sequence typing) bakterii *C. sakazakii* pochodzących z 7 krajów w 41 próbkach klinicznych wykazała obecność tego samego szczepu *C. sakazakii* ST4 w 20 próbkach zebranych w latach 1977–2008 pochodzących z 6 krajów (Holandia, Francja, USA, Nowa Zelandia, Republika Czeska i Kanada) [46]. Akineden i wsp. [2] donosi o wykryciu wysoce zjadliwego szczepu ST4, w dwóch próbkach mieszanki dla niemowląt w proszku.

5. Taksonomia *Cronobacter* spp.

Bakterie *Cronobacter* spp. są oksydazo ujemną, katalazo dodatnią, względnie beztlenową, Gram-ujemną, ruchliwą pałeczką. Redukują azotany, wykorzystują cytrynian, hydrolizują eskulinę i argininę oraz wytwarzają kwas z D-glukozy, D-sacharozy, D-rafinozy, D-melibiozy, D-celobiozy, D-mannitolu, D-mannozy, L-ramnozy, L-arabinozy, D-ksylozy, D-trehalozy, galakturonianu i D-maltozy. Bakterie rodzaju *Cronobacter* metabolizują substraty: 5-bromo-4-chloro-3-indolilo- α -D-glukopiranozyd, 4-metylumbelliferylo- α -D-glukopiranozyd, 4-nitofenylo- α -D-glukopiranozyd, 4-nitofenylo- β -D-glukopiranozyd, 4-nitofenylo- α -D-galaktopiranozyd i 4-nitofenylo- β -D-galaktopiranozyd. Bakterie *Cronobacter* spp. dają pozytywny wynik w produkcji acetoiny (test Vogesa-Proskauera) i negatywny w przypadku testu czerwieni metylowej. Produkują siarkowodor i hydrolizują mocznik. Rodzaj *Cronobacter* obejmuje siedem gatunków: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. universalis*, *C. dublinensis* i *C. condimenti* [39].

Nazwa gatunkowa *C. malonaticus* odnosi się do wykorzystania przez bakterię *C. malonaticus* malonianu. *C. malonaticus* pierwotnie wyizolowany był z ropnia piersi i jest dostępny pod numerem LMG 23826^T w BCCM/ LMG Bacteria Collection w Ghent (Belgia) oraz jako DSMZ 18702^T w Instytucie Leibniza DSMZ w Braunschweig (Niemcy) [39].

Gatunek *C. muytjensii* nazwany jest na cześć holenderskiego mikrobiologa Harry'ego Muytjensa. *C. muytjensii* ATCC 51329^T zdeponowano w Mannassas (USA) oraz jako CIP 103581^T dostępny jest w Instytucie Pasteura w Paryżu (Francja) [39].

Nazwa gatunkowa *C. dublinensis* odnosi się do miasta Dublin, w którym został wyizolowany po raz pierwszy w zakładzie produkcji mleka w proszku i dostępny jest pod numerem LMG 23823^T w BCCM/ LMG Bacteria Collection w Ghent (Belgia) oraz pod numerem DSMZ 18705^T w Instytucie Leibniza DSMZ w Braunschweig (Niemcy) [39]. Bakteria z gatunku *C. turicensis* pierwotnie wyizolowana została ze śmiertelnego przypadku noworodkowego zapalenia opon mózgoworodzeniowych w Zurychu w 2005 r. Szczep ten dostępny jest pod numerem LMG 23827^T BCCM/ LMG Bacteria Collection w Ghent (Belgia) oraz pod numerem DSMZ 18703^T w Instytucie Leibniza DSMZ w Braunschweig (Niemcy). Nazwa gatunkowa *C. turicensis* odnosi się do łacińskiej nazwy Zurychu-Turicum [39].

Początkowo *C. sakazakii* określano jako *Enterobacter cloacae*. W 1980 r. Farmer i wsp. przeklasyfikował *Enterobacter cloacae* jako nowy gatunek i nazwał na cześć japońskiego mikrobiologa Riichi Sakazakii – *Enterobacter sakazakii* [23]. Nazwę Rodzaju *Cronobacter* zaproponowano po analizie sekwencji genu 16S rRNA

różnych szczepów należących do gatunku *Enterobacter sakazakii* w wyniku której wyodrębniono sześć grup genomowych [85]. Gatunek *C. sakazakii* został wyodrębniony z gatunku *Enterobacter cloacae* w wyniku różnic w sekwencji DNA. DNA *C. sakazakii* jest w 53–54% homologiczne z DNA bakterii *Enterobacter* i *Citrobacter*. Na podstawie bliższego pokrewieństwa *C. sakazakii* do *E. cloacae*, (sekwencja genotypowa *C. sakazakii* jest w 51% identyczna z *E. cloacae* oraz w 41% z *Citrobacter freundii*) [38]. Pierwotny szczep *C. sakazakii* wyizolowano z gardła dziecka i dostępny jest pod numerem ATCC 29544^T w Mannassas w USA i pod numerem NCTC 11467^T w Londynie [38, 39].

Bakteria *C. sakazakii* jest jedynym gatunkiem *Cronobacter* spp., który posiada klaster genu *nanAKT*, kodujący wykorzystanie egzogenne kwasu sjałowego jako źródła węgla do wzrostu [47]. Grim i wsp. [26] stwierdzili, że szczepy *C. sakazakii* wykorzystują kwas sjałowy lub jego pochodną kwas N-acetyloneuraminowy, podczas gdy inne gatunki *Cronobacter* spp. nie wykorzystują tego kwasu. Stwierdzono również obecność dwóch regionów genomowych (GR127 i GR 129) u szczepu *C. sakazakii* BAA-894, które biorą udział w wykorzystywaniu kwasu sjałowego [26]. Kwas sjałowy występuje w mleku kobiecym, mieszankach mleko zastępczych, mleku modyfikowanym, mucynie wyścielającej jelita i jest składnikiem gangliozydów, które występują w komórce nerwowej i biorą udział w funkcjonowaniu tkanek nerwowych [47].

6. Występowanie *Cronobacter* spp. w żywności i środowisku szpitalnym

Bakterie z rodzaju *Cronobacter* spp. izolowano z preparatów mlekozastępczych wykorzystywanych w początkowym żywieniu niemowląt oraz z szerokiej gamy innych produktów spożywczych: warzyw, zbóż, płatków, ziemniaków, przypraw, mięsa, ryb, sera, tofu, ryżu, makaronu, czekolady, herbaty [8, 11, 24, 25, 33, 38, 56, 59, 85, 87]. W badaniu Berthold-Pluta i wsp. [8] wyizolowano 21 szczepów *Cronobacter* spp. (13 szczepów *C. sakazakii*, 4 szczepy *C. muytjensii*, 2 szczepy *C. turicensis*, 1 szczep *C. malonaticus* i 1 szczep *C. condimenti*) z warzyw liściastych i kielków. Li i wsp. [56] stwierdzili obecność *Cronobacter* spp. w produktach zbożowych i przyprawach. Lee i wsp. [54] wykazali, że *Cronobacter* spp. występuje także w zbożach i produktach zbożowych. Garbowska i wsp. [25] stwierdziły obecność *Cronobacter* spp. w ziołach (bazylia, oregano, pietruszka) oraz w mieszance przyprawowej (zioła prowansalskie). W badaniu Gurtler i wsp. [28] *Cronobacter* spp. stwierdzono w ryżu, owsie, mące, okruchach chleba. Obecność *Cronobacter* spp. w zbożach i produktach zbożowych może wynikać z obecności tej bak-

terii w środowisku naturalnym oraz z zanieczyszczeń zakładów produkcyjnych [56]. Bakterie *Cronobacter* spp. izolowano również z próbek pobranych z gospodarstw rolnych, zwierząt hodowlanych [63], a także ze środowiska: kurzu, wody, ścieków, gleby [33]. W Afryce Południowej wyizolowano *Cronobacter* spp. z 28 różnych prób żywności i środowiska, *C. sakazakii* stanowił 92,8% wyizolowanych szczepów [88].

Reich i wsp. w swojej pracy z roku 2010 [81] stwierdzili, że zanieczyszczenia mieszanek mlekozastępczych skorelowane były z zanieczyszczeniem środowiska produkcyjnego. Uwzględnia się dwie drogi zanieczyszczenia mieszanek mlekozastępczych: wewnętrzną i zewnętrzną. Wewnętrzna droga zanieczyszczenia dotyczy środowiska produkcyjnego. Podczas procesu produkcyjnego mleka modyfikowanego nieświadomie wykorzystuje się skażone surowce lub dochodzi do zanieczyszczenia krzyżowego. Zanieczyszczenie zewnętrzne spowodowane jest nieprawidłową higieną przygotowania mleka z mieszanek mlekozastępczych [2, 49]. Do nieprawidłowych praktyk higienicznych przygotowania mleka modyfikowanego należą: długie przechowywanie przygotowanej mieszanki, przechowywanie przygotowanej mieszanki w termosach oraz nieprawidłowy sposób mycia butelek i sprzętu służącego do przygotowania mleka. Alternatywą podgrzewania przygotowanej mieszanki w termosie jest możliwość podgrzewania samej wody służącej do przygotowania mleka. Mieszanek powinno dodawać się do wody bezpośrednio przed karmieniem. Pozostałości po karmieniu nie powinny być przechowywane, tylko natychmiast wylwane. Woda służąca do przygotowania mleka z mieszanki mlekozastępczej powinna mieć minimum 70°C [41].

Obecność *Cronobacter* spp. stwierdzono na powierzchniach, przedmiotach i sprzęcie medycznym w środowisku szpitalnym. Bakterie izolowano m.in. ze stetoskopu lekarskiego, szczotek używanych do mycia butelek oraz sprzętu używanego do przygotowania pokarmu dla niemowląt [33, 102].

7. Oporność *Cronobacter* spp. na warunki stresowe

Bakterie z rodzaju *Cronobacter* spp. mogą przeżyć w szerokim zakresie temperatur (od 5 do 44–47°C) oraz w produktach o niskiej aktywności wody [33], w temperaturze 4°C oraz przy aktywności wody od 0,30 do 0,83 może przetrwać nawet do 12 miesięcy [30].

Szczepy *Cronobacter* spp. w porównaniu z innymi bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae* wykazują wysoką tolerancję na stres środowiskowy (niskie pH, i a_w , wysoką temperaturę, stres osmotyczny, wysychanie) [18, 57]. Optymalna temperatura wzrostu wynosi 37–39°C, za maksymalną temperaturę wzrostu przyjęto 44–47°C. Należy jednak zauważyć, że *C. sakaza-*

kii ATCC 29544^T nie wykazuje wzrostu w temperaturze powyżej 42°C [67] jednakże temperatura ta wg ISO/TS 22964 z 2006 roku była temperaturą inkubacji bakterii. W temperaturze pokojowej (21°C) czas podwojenia bakterii *Cronobacter* spp. w rekonstruowanej mieszance mlecznej wynosił 75 min., natomiast w temperaturze 10°C około 10 h co oznacza, że jest zdolny do powolnego wzrostu w temperaturach chłodniczych. Wartości $D_{52} = 54,8$ min. i $D_{60} = 2,5$ min. ekstrapolowane do temperatury 72°C wskazują na wysoką termotolerancję bakterii *Cronobacter* spp. (wartość $z = 5,82^\circ\text{C}$). Wyjaśnia to ich przeżywalność podczas procesu produkcji odwodnionych mieszanek mlekozastępczych [38].

Oporność na wysuszenie szczepów *Conobacter* spp. jest prawdopodobnie spowodowana nagromadzeniem trehalozy wewnątrz komórek. Trehaloza działa jako środek ochronny [43]. Barron i Forsythe [6] stwierdzili także, że pozakomórkowe polisacharydy chronią komórki bakterii przed wysuszeniem. *C. sakazakii* produkuje beta-karoten, który chroni komórki bakterii przed rodnikami tlenowymi [45]. Wszystkie szczepy *Cronobacter* spp. mają geny kodujące trimetyloglicynę i trehalozę [45]. Umożliwia to przetrwanie bakteriom w środowisku i w produktach o niskiej aktywności wody [43]. Dodatkowo zidentyfikowano geny operonu biosyntezy celulozy, operon biosyntetyczny otoczki, gen *curli GR55*, których ekspresja może zapewnić odporność bakterii na niską aktywność wody [26].

Bakterie z rodzaju *Cronobacter* spp. są odporne na niskie pH, dlatego może przetrwać w kwaśnym środowisku żołądka. Niemowlęta nie mają w pełni rozwiniętej kwasowości żołądka, co może tłumaczyć zwiększone ryzyko infekcji powodowanych przez *Cronobacter*. W pH 4,5 w czasie 24 godzin bakterie z rodzaju *Cronobacter* spp. są zdolne do wzrostu do poziomu około 10^9 jtk/ml. Obecność genu *sodA* prawdopodobnie zapewnia oporność bakterii *Cronobacter* spp. na wewnątrzkomórkową oksydazę makrofagową i warunki kwasowe [43, 57].

8. Tworzenie biofilmu przez bakterie z rodzaju *Cronobacter*

Bakterie *Cronobacter* spp. tworzą biofilm, który może stanowić fizyczną barierę przed niekorzystnymi warunkami środowiskowymi. Tym samym bakterie stają się odporne na brak wody, dezynfekcję, temperaturę i antybiotyki. Bakterie z rodzaju *Cronobacter* spp. mają zdolność adhezji do szkła, stali nierdzewnej, silikonu, lateksu, poliwęglanu i plastiku. *C. sakazakii* wykazuje najsilniejszą adhezję do polichlorku winylu, następnie silikonu i stali nierdzewnej [27].

Noworodki urodzone przedwcześnie są często karmione za pomocą rurek nosowo-żołądkowych.

Wykazano, iż na rurkach istnieje znaczna ilość biofilmu, który składa się z grzybów i bakterii [34]. Szczep *Cronobacter* spp. i inne bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* wyizolowano z rurek nosowo-żołądkowych w ilości 10^7 jtk/cm [34]. Kinetyka wzrostu i tworzenia się biofilmu *C. sakazakii* na rurkach enteralnych, wykazała, że *C. sakazakii* może szybko przyłączyć się do powierzchni i namnażać się na materiale, z którego wykonana jest rurka już po 4 godzinach [34].

Komórki bakterii szybciej przyłączają się do materiałów hydrofobowych (teflon i tworzywa sztuczne), wolniej do powierzchni hydrofilowych (szkoło, metale) [43]. Temperatura i dostępność składników odżywczych wpływają na zdolność adhezji bakterii do powierzchni [27]. Bakterie w środowisku o ograniczonej zawartości substancji odżywczych, chętniej tworzą biofilm. Tworzenie biofilmu jest również procesem regulowanym na poziomie genetycznym [27, 51]. Wykazano, że gen *flhE* przyczynia się do tworzenia biofilmu przez bakterie *C. sakazakii* [100]. Gupta i wsp. [127] wykonali badanie przesiewowe genów odpowiedzialnych za powstawanie biofilmu (*mgt B*, *fli D*, *als S*, *flg J*, *cyo D*, *fts K*, *bcs C*, *flh E*). Wykazano, że geny *fli D*, *flg J* (biorące udział w syntezie rzęski) były obecne we wszystkich badanych szczepach *C. sakazakii* (27 szczepów). Gen *bcs C* (odpowiedzialny za syntezę celulozy) był nieobecny w sześciu izolatach *C. sakazakii*. Przypuszcza się, że białka PPlase, FlgE, DsbC są ważnymi czynnikami biorącymi udział w tworzeniu biofilmu. Białko PPlase bierze udział w fałdowaniu integralnych białek błony zewnętrznej (Omp) i patogenności. Białko FlgE jest niezbędne do kolonizacji i rozwoju biofilmu, natomiast białko DsbC, pod wpływem stresu oksydacyjnego, wykazuje aktywność izomerazy dwusiarczkowej, która odgrywa istotną rolę w procesie fałdowania białka. Uważa się również, że białka ESA_00281 i ESA00_00282 przyczyniają się do tworzenia biofilmu [43, 100].

9. Wykrywanie i oznaczanie liczby *Cronobacter* spp.

Na podstawie Rozporządzenia Komisji UE (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 z późniejszymi zmianami, *Cronobacter* spp. powinien być nieobecny w trzydziestu 10 g próbkach preparatów w proszku do początkowego żywienia niemowląt i żywności dietetycznej w proszku specjalnego przeznaczenia medycznego, przeznaczonego dla niemowląt w wieku do 6 miesięcy.

W 2017 roku wprowadzono normę EN ISO 22964:2017 – Mikrobiologia łańcucha żywnościowego – Horyzontalna metoda wykrywania *Cronobacter* spp., która zastępuje ISO/TS 22964:2006. Zmodyfikowany bulion laurylosiarczanowy (mLST) zastąpiono CSB (*Cronobacter* Selective Broth), a agar ESIA (*Enterobacter*

sakazakii Isolation Agar) zastąpiono CCI (*Chromogenic Cronobacter* Isolation Agar). Temperatura inkubacji powinna wynosić $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$. Bulion CSB nie zawiera laurylosiarczanu sodu, co może pozytywnie wpływać na odzysk wrażliwych szczepów *Cronobacter*. Agar CCI zawiera tiosiarczan sodu i cytrynian żelaza (III) amonu, w celu różnicowania *Cronobacter* spp. od innych *Enterobacteriaceae*. Dodatkowo agar CCI nie zawiera fioletu krystalicznego, natomiast ilość deoksy-cholanu sodu została zmniejszona. W normie EN ISO 22964:2017 zmieniono także metodę potwierdzania uzyskanych izolatów bakterii. Wytwarzanie na agarze TSA (*Tryptone Soy Agar*) żółtego, nie dyfundującego do podłoża barwnika, zastąpiono testami biochemicznymi, ponieważ produkcja żółtego barwnika nie jest niezawodnym kryterium identyfikacji. Iversen i wsp. (2007) wykazali, że 8% szczepów *Cronobacter* spp. nie produkowało barwnika, natomiast produkowało go 34% innych przedstawicieli rodzaju *Enterobacteriaceae* [7, 35, 36].

Wprowadzony w 2017 roku standard EN ISO 22964 wymienia 7 biochemicznych testów do potwierdzania wyników uzyskanych metodą hodowlaną. Sześć z tych testów zawiera zestaw ID 32E dlatego tradycyjne testy biochemiczne mogą zostać zastąpione gotowym zestawem. Jednak dostępne komercyjne zestawy testów biochemicznych ID32E i API 20E nie pozwalają na wiarygodną identyfikację izolatów *Cronobacter* na poziomie rodzaju. Poleganie na tej metodzie dostarcza fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych wyników. Około 80% szczepów *Cronobacter* zostało poprawnie zidentyfikowanych na poziomie rodzaju z wykorzystaniem bieżących wersji baz danych ID 32E i API 20E odpowiednio v. 4.0 i v. 5.0. Identyfikacja na poziomie gatunku z wykorzystaniem zestawu ID 32E dała poprawne wyniki w 50%. W przypadku kart Vitek GN wszystkie gatunki *Cronobacter* zostały zidentyfikowane jako *C. sakazakii*, do grupy tej zaliczono także przedstawicieli *Franconibacter* [42, 97].

Technika typowania molekularnego MLST (*Multi Locus Sequencing Typing*) początkowo wykorzystywana była do rozróżniania dwóch blisko spokrewnionych genetycznie *C. sakazakii* i *C. malonicus*. Obecnie schemat MLST *Cronobacter* wykorzystuje sekwencję 7 alleli metabolizmu podstawowego: *atpD*, *fusA*, *glnS*, *gltB*, *gyrB*, *infB* i *ppsA* dając połączoną sekwencję 3036 pz do analizy filogenetycznej i genomiki porównawczej. Schemat MLST dla *Cronobacter* został opracowany przez Adama Baldwin'a we współpracy ze Stephanem Forsythe, opublikowany w 2009 roku [3]. Pod adresem <http://www.pubMLST.org/cronobacter>) dostępna jest bezpłatna baza MLST zawierająca >2400 szczepów i 350 genomów. Dzięki temu rozwiązaniu rozpoznano kompleksy klonalne (CC) rodzaju *Cronobacter* spp. co umożliwia prawidłową identyfikację *Cronobacter* spp., a tym samym zmniejsza możliwość uzyskania

wyników fałszywie ujemnych. Ponadto MLST została również wykorzystana do formalnego uznania dwóch nowych gatunków *C. universalis* i *C. condimenti* oraz ujawniła silny związek pomiędzy sekwencją typu 4 (ST4) i przypadkami noworodkowego zapalenia opon mózgowych [69, 72]

Techniki identyfikacji oparte o DNA bakterii są uznane za bardziej niezawodne niż techniki oparte o cechy fenotypowe [43, 97]. W ciągu ostatnich kilku lat opracowano różne protokoły reakcji PCR i RT-PCR do identyfikacji bakterii *Cronobacter* spp. [96]. Wygenerowano kilka starterów PCR do identyfikacji bakterii rodzaju *Cronobacter* przez amplifikację specyficznych sekwencji i konserwatywnych regionów 16S rRNA bakterii [29, 55]. Jednak identyfikacja *Cronobacter* spp. z wykorzystaniem genu 16S rRNA jest problematyczna, ponieważ jest on obecny w wielu kopiach, w obrębie jednego genomu, cechujących się mikroheterogennością [3, 41]. Blisko spokrewnione, mające znaczenie kliniczne, gatunki *C. sakazakii* i *C. malonicus* są nierozróżnialne w oparciu o sekwencje 16S rRNA [37]. Chociaż nie ma prawnego obowiązku identyfikacji gatunkowej bakterii z rodzaju *Cronobacter* spp. [82] to wciąż poszukiwana jest metoda i sekwencja pozwalająca na taką identyfikację. Różnicowanie gatunkowe ma kluczowe znaczenie w badaniach epidemiologicznych, ocenie wrażliwości na antybiotyki i środki dezynfekujące. Ponadto producenci mieszanek mlekozastępczych ponoszą koszty związane z odrzuceniem partii produkcyjnej w wyniku fałszywie-dodatniej identyfikacji lub uwolnienia partii jako fałszywie bezpiecznej, co naraża noworodki na infekcję i jej skutki [42]. Sekwencje genów wykorzystywane dotychczas w identyfikacji gatunków *Cronobacter* spp. to: *cycA*, *gyrB*, *ompA*, *rpoB*, *gluA*, *fusA*, *dnaG*, *zpx*, 16S rRNA oraz geny odpowiedzialne za pozyskanie żelaza. Połączenie metod hodowlanych z metodami amplifikacji fragmentów genów pozwalających na wykrycie różnic tak małych jak pojedyncza para zasad wykorzystano do identyfikacji na poziomie gatunku. Vlach i wsp. [95] opracowali protokół PCR-RFLP do różnicowania siedmiu gatunków *Cronobacter* (*C. sakazakii*, *C. malonicus*, *C. turicensis*, *C. muytjesii*, *C. universalis*, *C. dublinensis* i *C. condimenti*). Protokół ten oparty jest na genie *rpoB* i zastosowaniu trzech endonukleaz restrykcyjnych (Csp 6I, Hin PII, Mbo I). PCR-RFLP jest prostą, powtarzalną i szybką metodą, którą można wykorzystać do identyfikacji gatunków *Cronobacter* [95].

Do identyfikacji bakterii *Cronobacter* spp. można wykorzystać również system spektrofotometrii masowej (MS – Mass Spektrometry) MALDI TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry), którego zasada polega na identyfikacji widm masowych komórek i składników komórkowych [52, 53]. Metoda wykorzystywana jest do identyfi-

kacji drobnoustrojów i analizy pokrewieństwa izolatów tego samego gatunku. W przypadku zastosowania systemu MALDI TOF MS do identyfikacji izolatów *Cronobacter* spp. najważniejszym czynnikiem gwarantującym wiarygodność i dokładność wyników identyfikacji na poziomie gatunkowym jest referencyjna baza danych zawierająca spektra profili białkowych szczepów *C. sakazakii* [97].

10. Antybiotykooporność *Cronobacter* spp.

Przed 1985 r. zakażenia powodowane przez *Cronobacter* leczono chloramfenikolem, gentamycyną i/lub ampicyliną [43]. W 1988 roku Willis i Robinson zaproponowali łączenie ampicyliny i gentamycyny w leczeniu zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, wywołanego przez *Cronobacter*. Li i wsp. [56] wykazali, że wyizolowane szczepy *Cronobacter* spp. były wrażliwe na gentamycynę, tetracyklinę, trimetoprim i kwas nalidyksowy. Jeden z 13 wyizolowanych szczepów był oporny na ampicylinę [56].

W badaniu Berthold-Pluta i wsp. [8] wykazano, że 21 wyizolowanych z warzyw liściastych i kiełków szczepów *Cronobacter* spp. było wrażliwych na ampicylinę, cefepim, chloramfenikol, gentamycynę, streptomycynę, tetracyklinę, cyprofloksacynę i cotrimoksazol.

Dwa szczepy *Cronobacter* spp. badane przez Shadli-Matung i wsp. [83] były odporne na penicylinę i cefalosporynę, a wrażliwe na gentamycynę, tetracyklinę i streptomycynę. W badaniu Oonaka i wsp. [70] dziewięć spośród 36 wyizolowanych szczepów było wrażliwych na cefalosporyny.

Nazarowiec – White i Farber [67] wykazali, że dwa z osiemnastu zbadanych szczepów było opornych na chloramfenikol i tetracykliny. Podobne wyniki uzyskali Lee i wsp. [54] przedstawili badanie, gdzie dwa spośród 66 szczepów *Cronobacter* spp. wyizolowanych z żywności na terenie Korei były odporne na chloramfenikol a siedem na streptomycynę.

Kim i wsp. [48] wykazali, że dwa szczepy *Cronobacter* spp. wyizolowane od niemowląt poniżej pierwszego roku życia były wrażliwe na kanamycynę, kwas nalidyksowy, gentamycynę, chloramfenikol, tetracyklinę i cyprofloksacynę oraz odporne na ampicylinę i cefalotyne.

El-Sharoud i wsp [19] badali oporność na antybiotyki 16 izolatów *Cronobacter* spp. z mleka w proszku. Wszystkie izolaty wrażliwe były na streptomycynę, ampicylinę i gentamycynę. Dwa izolaty odporne były na neomycynę, a jeden na neomycynę i trimetoprim. Xu i wsp. [99] badając 71 szczepów wyizolowanych z żywności typu ready-to-eat na terenie południowo-wschodnich Chin, wykazali, że wszystkie szczepy *Cronobacter* spp. wrażliwe były na tetracyklinę, kwas nalidyksowy, cyprofloksacynę i cefatoksym. Oporność na

penicylinę stwierdzono u 84% a na cefalotynę u 46,5% badanych szczepów.

Antybiotyki β -laktamowe (penicyliny, cefalosporyny, karbapenemy, monobaktamy) są największą grupą antybiotyków, używaną do leczenia większości rodzajów zakażeń. Oporność bakterii na β -laktamy jest warunkowana różnorodnymi mechanizmami. Jednym z nich jest wytwarzanie β -laktamaz (enzymów hydrolizujących cząsteczki β -laktamów) [68].

Bakterie z rodzaju *Cronobacter* spp. mogą wytwarzać enzym β -laktamazę. Pitout i wsp. [75] wykazali, że niektóre szczepy *Cronobacter* produkują β -laktamazę, ale na niskim poziomie. Caubilla-Barron i wsp. [13] zidentyfikowali dwa izolaty, które produkowały β -laktamazę o rozszerzonym spektrum działania. Zhou i wsp. [102] opisali jeden izolat *Cronobacter* otrzymany z mieszanek mlekozastępczych, który wytwarzał β -laktamazę o rozszerzonym spektrum działania.

Prowadzone są badania nad mechanizmem antybiotykoodporności *Cronobacter* spp. W wyniku nadużywania antybiotyków istnieje potencjał uzyskania wysokiej oporności na antybiotyki przez różne szczepy bakterii [49].

11. Podsumowanie

Bakterie *Cronobacter* powszechnie występują w środowisku naturalnym i mogą stanowić poważne zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka. Najbardziej narażone na zakażenia wywołane przez bakterie *Cronobacter* spp. są noworodki poniżej 28 dnia życia, noworodki urodzone przedwcześnie, niemowlęta o niskiej masie urodzeniowej (poniżej 2,5 kg) i niemowlęta z upośledzeniem odporności. Chociaż zakażenia wywołane przez *Cronobacter* spp. występują rzadko to współczynnik śmiertelności zakażonych pacjentów wynosi 40–80% przypadków. Oszacowane koszty leczenia pojedynczej infekcji wywołanej przez *C. sakazakii* oraz koszty długoterminowego leczenia powikłań po infekcji przekroczyły 5 milionów dolarów [62]. Szczep *C. sakazakii* wśród 7 gatunków bakterii zaliczanych do tego rodzaju jest uznawany za najbardziej oportunistyczny patogen odpowiedzialny za bakteremię, zapalenie opon mózgowych i martwicze zapalenie jelit. Dzięki produkcji otoczek i biofilmu, wysokiej termotoleracyjności jest odporny na wysuszenie i wykazuje przeżywalność w mieszkankach mlekozastępczych i innych produktach o niskiej aktywności wody. Po wnikięciu do organizmu może atakować komórki nabłonkowe jelit, a nawet komórki śródbłonki mikronaczyniowego mózgu wykazując potencjał do wywoływania zapalenia opon mózgowych. Dlatego kontrola oraz regulacje prawne w przypadku *C. sakazakii* są niezbędne [51]. W ramach zarządzania ryzykiem mikrobiologicznym związanym z występowaniem bakterii *Cronobacter* spp. w mieszkankach mlekozastępczych

(PIF i FUF) odbyły się trzy spotkania grupy ekspertów FAO-WHO wspierane przez Komisję Kodeksu Żywnościowego, w wyniku których opracowano model oceny ryzyka, który dostarczył informacji o ryzyku oraz porad i wytycznych zmniejszających ryzyko zakażenia niemowląt w wyniku konsumpcji mleka modyfikowanego w proszku [20, 21, 22]. Wypracowane w 2006 roku na spotkaniach technicznych FAO-WHO rozwiązania zostały sfinalizowane w przyjętym na 31 sesji Komisji Kodeksu Żywnościowego (04.06–04.07.2008) Kodeksie Praktyk Higienicznych dla Preparatów w Proszku dla Niemowląt i Małych Dzieci (CAC 2008a). W roku 2005 na mocy Rozporządzenia Komisji (WE) nr 2073/2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych wprowadzono kryteria dotyczące bezpieczeństwa mikrobiologicznego preparatów w proszku dla niemowląt i żywności dietetycznej w proszku specjalnego przeznaczenia medycznego przeznaczona dla niemowląt w wieku do 6 miesięcy. Bakterie należące do rodzaju *Cronobacter* muszą być nieobecne w 30 dziesięcio-gramowych próbkach mieszanki mlekozastępczej. Analiza wykonywana jest metodą hodowlaną z potwierdzeniem biochemicznym według zmodyfikowanego protokołu opisanego w standardzie EN ISO 22964:2017 Mikrobiologia łańcucha żywnościowego – Horyzontalna metoda wykrywania *Cronobacter* spp. Mimo to w dalszym ciągu obserwuje się przypadki zakażeń, co może być spowodowane nieskuteczną diagnostyką. Tradycyjne hodowlane metody mikrobiologiczne są czasochłonne i obarczone błędem. Metody biochemiczne dostarczają fałszywie ujemnych lub fałszywie dodatnich wyników w przeciwieństwie do analiz PCR, których wyniki są bardziej niezawodne, jednak są droższe i pracochłonne przez co nie są wykonywane przez producentów mieszanek mlekozastępczych. Do bardziej wiarygodnych i skutecznych metod zaliczana jest metoda MALDI TOF i PCR-RFLP. Najskuteczniejszym narzędziem wykrywania *Cronobacter* spp. jest kombinacja stosowanych metod, w celu uzyskania wiarygodnych i powtarzalnych wyników. FDA Bacteriological Analytical Manual włącza PCR jako metodę skринingową, jednak wyniki należy potwierdzić metodą hodowlaną. Jako metodę biochemicznej identyfikacji zalecane jest użycie ID32E lub Vitek 2 GN.

Piśmiennictwo

1. Aguirre-Conde A., Pérez-Legorburu A., Echániz-Urcelay I., Hernando-Zaráte Z., Arrate-Zugabeitia J.K.: Sepsis neonatal por. *Enterobacter sakazakii*. *An. Pediatr. (Barc)*. **66**, 196–197 (2007)
2. Akineden O., Heinrich V., Grossb M., Usleber E.: Reassessment of *Cronobacter* spp. originally isolated as *Enterobacter sakazakii* from infant food. *Food Microbiol.* **65**, 44–50 (2017)
3. Baldwin A., Loughlin M., Caubilla-Barron J., Kucerova E., Manning G., Dowson C., Forsythe S.: Multilocus sequence typing

- of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* reveals stable clonal structures with clinical significance which do not correlate with biotypes. *BMC Microbiol.* **9**, 1–9 (2009)
4. Bar-Oz B., Preminger A., Peleg O., Block C., Arad I.: *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. *Acta. Paediatr.* **90**, 356–358 (2001)
 5. Barreira E.R., Costa de Souza D., de Freitas Góis P., Fernandes J.C.: Meningite por *Enterobacter sakazakii* em recém-nascido: relato de caso. *Pediatria (São Paulo)*, **25**, 65–70 (2003)
 6. Barron J.C., Forsythe S.J.: Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula. *J. Food Prot.* **70**, 2111–2117 (2007)
 7. Benito de A., Besseb N.G., Desforges I., Gertend B., Ruiz B., Tomás D.: Validation of standard method EN ISO 22964: 2017 – Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp. *Int. J. Food Microbiol.* **288**, 47–52 (2019)
 8. Berthold-Pluta A., Garbowska M., Stefańska I., Pluta A.: Microbiological quality of selected ready-to-eat leaf vegetables, sprouts and non-pasteurized fresh fruit-vegetable juices including the presence of *Cronobacter* spp. *Food Microbiol.* **65**, 221–230 (2017)
 9. Biering G., Karlsson S., Clark N.C., Jónsdóttir K.E., Ludvigsson P., Steingrímsson O.: Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 2054–2056 (1989)
 10. Block C., Peleg O., Minster N., Bar-Oz B., Simhon A., Arad I., Shapiro M.: Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **21**, 613–616 (2002)
 11. Bowen A., Wiesenfeld H.C., Kloesz J.L., Pasculle A.W., Nowalk A.J., Brink L., Elliot E., Martin H., Tarr C.L.: Notes from the Field: *Cronobacter sakazakii* infection associated with feeding extrinsically contaminated expressed human milk to a premature infant-Pennsylvania, 2016. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **66**, 761–762 (2017)
 12. Burdette J. H., Santos C.: *Enterobacter sakazakii* brain abscess in the neonate: the importance of neuroradiologic imaging. *Pediatr. Radiol.* **30**, 33–34 (2000)
 13. Caubilla-Barron J., Hurrell E., Townsend S., Cheetham P., Loc-Carrillo C., Fayet O., Pre're M.F., Forsythe S.J.: Genotypic and phenotypic analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from an outbreak resulting in fatalities in a neonatal intensive care unit in France. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 3979–3985 (2007)
 14. Chaves C.E.V., Brandão M.L.L., Lacerda M.L.G.G., Rocha C.A.B.C., Leone de Oliveira S.M.D.V., Parpinelli T.C., Vasconcellos L., Forsythe S.J., Paniago A.M.M.: Fatal *Cronobacter sakazakii* sequence type 494 meningitis in a newborn, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, 1948–1950 (2018)
 15. Coignard B., Desenclos J.C. i wsp.: Infections sévères à *Enterobacter sakazakii* chez des nouveau-nés ayant consommé une préparation en poudre pour nourissons, France, octobre-décembre 2004. *Bull. Epidemiol. Hebd.* **2**, 10–13 (2006)
 16. Cruz A., Xicohtencatl-Cortes J., Gonzalez-Pedrajo B., Bobadilla M., Eslava C., Rosas I.: Virulence traits in *Cronobacter* species isolated from different sources. *Can J. Microbiol.* **57**, 735–744 (2011)
 17. Cui J.H., Yu B., Xiang Y., Zhang Z., Zhang T., Zeng Y.C., Cui Z.G., Huo X.X.: Two cases of multi-antibiotic resistant *Cronobacter* spp. infections of infants in China. *Biomed. Environ. Sci.* **30**, 601–605 (2017)
 18. Dancer G.I., Mah J.H., Rhee M.S., Hwang I.G., Kang D.H.: Resistance of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) to environmental stresses. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 1606–1614 (2009)
 19. El-Sharoud W.M., O'Brien S., Negredo C., Iversen C., Fanning S., Healy B.: Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products, *BMC Microbiol.* **9**, 1–9 (2009)
 20. FAO-WHO Food Agricultural Organization-World Health Organization: *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula, Meeting Report Microbiological Risk Assessment 6, Geneva, Switzerland (2004) <http://www.who.int/foodsafety/publications/mra6-enterobacter-sakazakii/en/> (03.12.2019)
 21. FAO-WHO Food Agricultural Organization-World Health Organization: *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula, Meeting Report Microbiological Risk Assessment 10, Geneva, Switzerland (2006) <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra10/en/index.html> (03.12.2019)
 22. FAO-WHO Food Agricultural Organization-World Health Organization: *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formula, Meeting Report Microbiological Risk Assessment 15, Geneva, Switzerland (2008) http://www.who.int/foodsafety/publications/mra_followup/en/ (03.12.2019)
 23. Farmer J., Asbury M., Hickman F., Brenner D.: *Enterobacter sakazakii*, new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **86**, 221–225 (1980)
 24. Friedemann M.: Epidemiology of invasive neonatal *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**, 1297–1304 (2009)
 25. Garbowska M., Berthold-Pluta A., Stasiak-Różańska L.: Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter* spp. *Food Microbiol.* **49**, 1–5 (2015)
 26. Grim C.J., Tall B.D. i wsp.: Pan-genome analysis of the emerging foodborne pathogen *Cronobacter* spp. suggests a species-level bidirectional divergence driven by niche adaptation. *BMC Genomics*, **14**, 1–16 (2013)
 27. Gupta T.B., Mowat E., Brightwell G., Flint S.H.: Biofilm formation and genetic characterization of New Zealand *Cronobacter* isolates. *J. Food Safety*. 1–13 (2017)
 28. Gurtler J.B., Kornacki J.L., Beuchat L.R.: *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *Int. J. Food Microbiol.* **104**, 1–34 (2005)
 29. Hassan A., Akineden A., Kress C., Estuningsih S., Schneider E., Usleber E.: Characterization of the gene encoding the 16S rRNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species specific PCR method. *Int. J. Food Microbiol.* **116**, 214–220 (2007)
 30. Henry M., Fouladkhah A.: Outbreak history, biofilm formation and preventive measures for control of *Cronobacter sakazakii* in infant formula and infant care settings. *Microorganisms*, **7**, 1–22 (2019)
 31. Himelright I., Jernigan D. i wsp.: *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula-Tennessee, 2001. *J. Am. Med. Assoc.* **287**, 2204–2205 (2002)
 32. Holý O., Forsythe S.: *Cronobacter* spp. as emerging causes of healthcare-associated infection. *J. Hosp. Infect.* **86**, 169–177 (2014)
 33. Hu L., Grim C.J., Franco A.A., Jarvis K.G., Sathyamoorthy V., Kothary M.H., Tall B.D.: Analysis of the cellulose synthase operon genes, *bcsA*, *bcsB*, and *bcsC* in *Cronobacter* species: Prevalence among species and their roles in biofilm formation and cell-cell aggregation. *Food Microbiol.* **52**, 97–105 (2015)
 34. Hurrell E., Kucerova, E., Loughlin M., Caubilla-Barron J., Forsythe, S.J.: Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* serovars and other *Enterobacteriaceae*. *Int. J. Food Microbiol.* **136**, 227–231 (2009)

35. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp. <https://www.iso.org/standard/64708.html> (04.11.2019)
36. ISO/TS 22964:2006 (IDF/RM 210: 2006) Milk and milk products – Detection of *Enterobacter sakazakii*, <https://www.iso.org/standard/41258.html> (04.11.2019)
37. Iversen C., Druggan P., Schumacher S., Lehner A., Feer C., Gschwend K., Joosten H., Stephan R.: Development of a Novel Screening Method for the Isolation of “*Cronobacter*” spp. (*Enterobacter sakazakii*). *Appl. Environ. Microb.* **74**, 2550–2553 (2008)
38. Iversen C., Forsythe S.: Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci. Tech.* **14**, 443–454 (2003)
39. Iversen C., Lehner A., Mullane N., Bidlas E., Cleenwerck I., Marugg J., Fanning S., Stephan R., Joosten H.: The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies. *BMC Evol. Biol.* **7**, 1–11 (2007)
40. Iversen C., Lehner A., Mullane N., Marugg J., Fanning S., Stephan R., Joosten H.: Identification of “*Cronobacter*” spp. (*Enterobacter sakazakii*). *J. Clin. Microbiol.* **45**, 11, (2007)
41. Jackson E.E., Flores J.P., Fernández-Escartín E., Forsythe S.J.: Reevaluation of a suspected *Cronobacter sakazakii* outbreak in Mexico. *J. Food Protect.* **78**, 1191–1196 (2015)
42. Jackson E.E., Forsythe S.J.: Comparative study of *Cronobacter* identification according the phenotyping methods. *BMC Microbiol.* **16**, 146, (2016)
43. Jaradat Z.W., Mousa W.A., Elbetieha A., Nabulsi A., Tall B.D.: *Cronobacter* spp. – opportunistic food-borne pathogens. A review of their virulence and environmental-adaptive traits. *J. Med. Microbiol.* **63**, 1023–1037 (2014)
44. Jarvis C.: Fatal *Enterobacter sakazakii* infection associated with powdered infant formula in a neonatal intensive care unit in New Zealand. *Am. J. Infect. Control.* **33**, 19– 54 (2005)
45. Joseph S., Forsythe S.J. i wsp.: Comparative analysis of genome sequences covering the seven *Cronobacter* species. *Plos ONE*, **7**, 1–13 (2012)
46. Joseph S., Forsythe S.J.: Predominance of *Cronobacter sakazakii* sequence type 4 in neonatal infections. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 1713–1715 (2011)
47. Joseph S., Hariri S., Masood N., Forsythe S.J.: Sialic acid utilization by *Cronobacter sakazakii*. *Microb. Inform. Exp.* **3**, 1–11 (2013)
48. Kim J.B., Cho S.H., Park Y.B., Lee J.B., Kim J.C., Lee B.K., Lee H.K., Chae H.S.: Surveillance of stool samples for the presence of *Enterobacter sakazakii* among Korean people. *Yonsei Med. J.* **49**, 1017–1022 (2008)
49. Kim K., Jang S.S., Kim S.K., Park J.H., Heu S., Ryu S.: Prevalence and genetic diversity of *Enterobacter sakazakii* in ingredients of infant foods. *Int. J. Food Microbiol.* **122**, 196–203 (2008)
50. Kim K., Kim K.P., Choi J., Lim J.A., Lee J., Hwang S., Ryu S.: Outer membrane proteins A (OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral invasion of *Cronobacter sakazakii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 5188–5198 (2010)
51. Kim S., Kim Y.T., Yoon H., Lee J.H., Ryu S.: The complete genome sequence of *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 T, a goodborne pathogen, isolated from a child’s throat. *Gut Pathog.* **9**, 1–7 (2017)
52. Kosikowska U., Stępień-Pyśniak D., Pietras-Ożga D., Andrzejczuk S., Juda M., Malm A.: Zastosowanie spektrofotometrii masowej MALDI-TOF MS w identyfikacji bakterii izolowanych z materiałów klinicznych od ludzi i zwierząt. *Diagn. Lab.* **51**, 23–30 (2015)
53. Lai K.K.: *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children and adults a case reports and a review of the literature. *Medicine*, **80**, 113–122 (2001)
54. Lee Y.D., Park J.H., Chang H.: Detection, antibiotic susceptibility and biofilm formation of *Cronobacter* spp. from various foods in Korea. *Food Control.* **24**, 225–230 (2012)
55. Lehner A., Tasara T., Stephan R.: 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification. *BMC Microbiol.* **4**, 1–7 (2004)
56. Li Y., Chen Q., Zhao J., Jiang H., Lu F., Bie X., Lu Z.: Isolation, identification and antimicrobial resistance of *Cronobacter* spp. isolated from various foods in China. *Food Control.* **37**, 109–114 (2014)
57. Ling N., Zhang J., Li C., Zeng H., He W., Ye Y., Wu Q.: The Glutaredoxin Gene, *grxB*, Affects acid tolerance, Surface hydrophobicity, auto-aggregation and biofilm formation in *Cronobacter sakazakii*. *Front. Microbiol.* **9**, 1–12 (2018)
58. Liu Q., Mittal R., Emami C.N., Iversen C., Ford H.R., Prasad Rao N.V.: Human isolates of *Cronobacter sakazakii* bind efficiently to intestinal epithelial cells in vitro to induce monolayer permeability and apoptosis. *J. Surg. Res.* **176**, 437–447 (2012)
59. Maćkiw E., Rzeżuska K., Tomczuk K., Izak D., Stoś K.: Występowanie *Cronobacter* sp. w wybranych produktach spożywczych. *Żywn. Nauk. Technol. Jakość.* **4**, 172–178 (2011)
60. Mange J.P., Stephan R., Borel N., Wild P., Kim K.S., Pospischil A., Lehner A.: Adhesive properties of *Enterobacter sakazakii* to human epithelial and brain microvascular endothelial cells. *BMC Microbiol.* **6**, 1–10 (2006)
61. McMullan R., Menon V., Beukers A.G., Jensen S.O., van Hal S.J., Davis R.: *Cronobacter sakazakii* infection from expressed breast milk, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, 393–394 (2018)
62. Minor T., Lasher A., Brown B., Nordinelli Z., Zorn D.: The per case and total annual costs of foodborne illness in the United States. *Risk Anal.* **35**, 1125–1139 (2015)
63. Molloy C., Cagney C., O’Brien S., Iversen C., Fanning S., Duffy G.: Surveillance and characterisation by pulsed-field gel electrophoresis of *Cronobacter* spp. in farming and domestic environments, food production animals and retail foods. *Int. J. Food Microbiol.* **136**, 198–203 (2009)
64. Monroe P.W., Tift W.L.: Bacteremia associated with *Enterobacter sakazakii* (yellow, pigmented *Enterobacter cloacae*). *J. Clin. Microbiol.* **10**, 850–851 (1979)
65. Muytjens H.L., Zanen H.C., Sonderkamp H.J., Kollée L.A., Wachsmuth I.K., Farmer J.J.: Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 115–120 (1983)
66. Nair M.K.M., Venkitanarayanan K.S.: Cloning and sequencing of the *ompA* gene of *Enterobacter sakazakii* and development of an *ompA* targeted PCR for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2539–2546 (2006)
67. Nazarowec-White M., Farber J.M.: Incidence, survival, and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J. Food Protect.* **60**, 226–230 (1999)
68. Nikonorow E., Baraniak A., Gniadkowski M.: Oporność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* na antybiotyki β -laktamowe wynikająca z wytwarzania β -laktamaz. *Post. Mikrobiol.* **3**, 261–271 (2013)
69. Ogrodzki P., Forsythe S.J.: DNA-sequence based typing of the *Cronobacter* genus using MLST, CRISPR-cas array and capsular profiling. *Front. Microbiol.* **8**, 1–15 (2017)

70. Oonaka K., Furuhashi K., Hara M., Fukuyama M.: Powder infant formula milk contaminated with *Enterobacter sakazakii*. *J. Infect. Dis.* **63**, 103–107 (2010)
71. Pagotto F.J., Nazarowec-White M., Bidawid S., Farber J.M.: *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo. *J. Food. Prot.* **66**, 370–375 (2003)
72. Parra-Flores J., Cerda-Leal F., Contreras A., Valenzuela-Riffo N., Alejandra Rodríguez A., Aguirre J.: *Cronobacter sakazakii* and microbiological parameters in dairy formulas associated with a food alert in Chile. *Front. Microbiol.* **9**, 1–9 (2018)
73. Pavcnik-Arnol M., Hojker S., Derganc M.: Lipopolysaccharide – binding protein, lipopolysaccharide, and soluble CD14 in sepsis of critically ill neonates and children. *Intens. Care. Med.* **33**, 1025–1032 (2007)
74. Pei X., Li Y., Zhang H., Zhan L., Yu X., Lan G., Jia H., Li N., Yang D., Mei L.: Surveillance and characterization of *Cronobacter* in powdered infant formula processing factories. *Food Control.* **96**, 318–323 (2019)
75. Pitout J.D., Moland E.S., Sanders C.C., Thomson K.S., Fitzsimmons S.R.: Beta-lactamases and detection of betalactam resistance in *Enterobacter* spp. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **41**, 35–39 (1997)
76. Raghav M., Aggarwal P.K.: Purification and characterization of *Enterobacter sakazakii* enterotoxin. *Can. J. Microbiol.* **53**, 750–755 (2007)
77. RASFF Alert notification 2002/190: *Enterobacter sakazakii* in infant formula from Germany(2002), https://webgate.ec.europa.eu/rasffwindow/portal/?event=notificationDetail&NOTIF_REFERENCE=2002.190 (02.06.2019)
78. RASFF Alert notification 2004/658: *Enterobacter sakazakii* in infant formula (2004) https://webgate.ec.europa.eu/rasffwindow/portal/?event=notificationDetail&NOTIF_REFERENCE=2004.658 (02.06.2019)
79. RASFF Alert notification 2007/452: *Enterobacter sakazakii* (present/10 g) in infant formula from Switzerland via Germany (2007) https://webgate.ec.europa.eu/rasffwindow/portal/?event=notificationDetail&NOTIF_REFERENCE=2007.452 (02.06.2019)
80. Ray P., Das A., Gautam V., Jain N., Narang A., Sharma M.: *Enterobacter sakazakii* in infants: novel phenomenon in India. *Indian J. Med. Microbiol.* **25**, 408–410 (2007)
81. Reich F., König R., Wiese W., Klein G.: Prevalence of *Cronobacter* spp. in a powdered infant formula processing environment. *Int. J. Food Microbiol.* **140**, 214–217 (2010)
82. Rozporządzenie Komisji (WE) NR 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych, <https://eurlex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20111201&from=EN> (04.09.2019)
83. Shadlia-Matung M., Aidoo K.E., Candlish A.A., Elgebri A.M.: Evaluation of some antibiotics against pathogenic bacteria isolated from infant foods in North Africa. *Open Food Sci. J.* **2**, 95–101 (2008)
84. Simmons B.P., Gelfand M.S., Haas M., Metts L., Ferguson J.: *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **10**, 398–401 (1989)
85. Sosnowski M., Czubkowska A., Korpysa-Dzirba W., Ostrowska M., Rola J., Osek J.: *Cronobacter sakazakii* – charakterystyka i znaczenie w mikrobiologii żywności. *Med. Weter.* **70**, 669–672 (2010)
86. Stoll B.J., Hansen N., Fanaroff A.A., Lemons J.A.: *Enterobacter sakazakii* is a rare cause of neonatal septicemia or meningitis in VLBW infants. *J. Pediatr.* **144**, 821–823 (2004)
87. Stasiak-Różańska L., Garbowska M., Bertold A., Molska I., Ciepielewska-Janias J.: Jakość mikrobiologiczna preparatów do żywienia niemowląt i małych dzieci ze szczególnym uwzględnieniem *Enterobacteriaceae* i *E. sakazakii*. *Med. Weter.* **66**, 622–625 (2010)
88. Strydom A., Cameron M., Witthuhn R.C.: PCR-RFLP analysis of the *rpoB* gene to distinguish the five species of *Cronobacter*. *Food Microbiol.* **28**, 1472–1477 (2011)
89. Suijkerbuijk A.W.M. Gesignaleerd. *Infectieziekten Bulletin*, **16**, 1–3 (2005)
90. Sundararajan M., Cope J. i wsp.: Notes from the Field: *Cronobacter sakazakii* meningitis in a full-term neonate fed exclusively with breast milk — Indiana, 2018. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **67**, 1248–1249 (2018)
91. Townsend S.M., Hurrell E., Gonzalez-Gomez I., Lowe J., Frye J.G., Forsythe S., Badger J.L.: *Enterobacter sakazakii* invades brain capillary endothelial cells, persists in human macrophages influencing cytokine secretion and induces severe brain pathology in the neonatal rat. *Microbiology*, **153**, 3538–3547 (2007)
92. Townsend S., Hurrell E., Forsythe S.: Virulence studies of *Enterobacter sakazakii* isolates associated with a neonatal intensive care unit outbreak. *BMC Microbiol.* **8**, 1–9 (2008)
93. Urmenyi A.M., Franklin A.W.: Neonatal death from pigmented coli form infection. *Lancet*, **12**, 313–315 (1961)
94. van Acker J., de Smet F., Muyldermans G., Bougateg A., Naesens A., Lauwers S.: Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 293–297 (2001)
95. Vlach J., Javůrková B., Karamonová L., Blažková M., Fukal L.: Novel PCR-RFLP system based on *rpoB* gene for differentiation of *Cronobacter* species. *Food Microbiol.* **62**, 1–8 (2017)
96. Wang L., Hu X., Tao G., Wang X.: Outer membrane defect and stronger biofilm formation caused by inactivation of a gene encoding for heptosyltransferase I in *Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894. *J. App. Microbiol.* **112**, 985–997 (2012)
97. Wang Q., Forsythe S.J., Zhao X.J., Wang Z.W., Li D., Ma D., Cao J.Y., Zeng J.: Species identification and molecular characterization of *Cronobacter* spp. isolated from food imported over nine years into Beijing, China. *Food Microbiol.* **82**, 11–19 (2019)
98. Willis J., Robinson, J.E.: *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **7**, 196–199 (1988)
99. Xu X., Li C., Wu Q., Zhang J., Huang J., Yang G.: Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. in Chinese ready-to-eat foods. *Int. J. Food Microbiol.* **204**, 17–23 (2015)
100. Ye Y., Jiao R., Gao J., Li H., Ling N., Wu Q., Zhang J., Xu X.: Proteins involved in responses to biofilm and planktonic modes in *Cronobacter sakazakii*. *LWT – Food Sci. Technol.* **65**, 1093–1099 (2016)
101. Zeng H., Wu Q. i wsp.: Novel multidrug-resistant *Cronobacter sakazakii* causing meningitis in neonate, China, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, 2121–2124 (2018)
102. Zhou X., Gao J., Huang Y., Fu S., Chen H.: Antibiotic resistance pattern of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter sakazakii* isolates from powdered infant formula. *Afr. J. Microbiol. Res.* **5**, 3073–3077 (2011)

Warszawa, 23.05.2025

Mateusz Gemba
mateusz_gemba@wp.pl

**Rada Dyscypliny Technologii
Żywności i Żywienia
Szkoly Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Mateusz Gemba, Elżbieta Rosiak, Danuta Kołożyn-Krajewska (2020). *Cronobacter spp. – poważne zagrożenie w żywności dla niemowląt*. Postępy mikrobiologii, 59, 1, 139-15. DOI: 10.21307/PM-2020.59.2.011 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji badania, przeprowadzeniu przeglądu literatury, pisaniu, edycji i gromadzeniu danych, wizualizacji i napisaniu oryginalnego draftu artykułu.

Podpis

Mateusz Gemba

Warszawa, 23.05.2025

Elżbieta Rosiak
elzbieta_rosiak@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologii
Żywności i Żywienia
Szkoly Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Mateusz Gemba, Elżbieta Rosiak, Danuta Kołożyn-Krajewska (2020). *Cronobacter spp. – poważne zagrożenie w żywności dla niemowląt*. Postępy mikrobiologii, 59, 1, 139-15. DOI: 10.21307/PM-2020.59.2.011 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji badania, pisaniu, edycji i korekcie merytorycznej, korespondencji z wydawcą.



Podpis

Warszawa, 23.05.2025

Danuta Kołożyn-Krajewska
danuta_kolozyn_krajewska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologii
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Mateusz Gemba, Elżbieta Rosiak, Danuta Kołożyn-Krajewska (2020). *Cronobacter spp.* – poważne zagrożenie w żywności dla niemowląt. Postępy mikrobiologii, 59, 1, 139-15. DOI: 10.21307/PM-2020.59.2.011 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wizualizacji, edycji i korekcie merytorycznej artykułu.

Podpis



Article

Factors Influencing Biofilm Formation by *Salmonella enterica* sv. Typhimurium, *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *Pantoea* spp., and *Bacillus* spp. Isolated from Human Milk Determined by PCA Analysis

Mateusz Gemba ¹, Elżbieta Rosiak ^{1,*} , Zuzanna Nowak-Życzyńska ², Paulina Kałęcka ¹, Elżbieta Łodykowska ³ and Danuta Kołożyn-Krajewska ¹

¹ Institute of Human Nutrition, Department of Food Hygiene and Quality Management, Warsaw University of Life Sciences—SGGW, 02-786 Warsaw, Poland

² Institute of Animal Sciences, Department of Food Hygiene and Quality Management, Warsaw University of Life Sciences—SGGW, 02-768 Warsaw, Poland

³ St. Holy Family Specialist Hospital, Regional Bank of Human Milk, 02-544 Warsaw, Poland

* Correspondence: elzbieta_rosiak@sggw.edu.pl; Tel.: +48-22-593-7070

Abstract: Bacteria enter milk during poor hygiene practices and can form a biofilm on surfaces that come into contact with human milk. The presence of a biofilm increases the risk of infections among newborns as bacteria protected by biofilm are resistant to washing and disinfection processes. The formation of the biofilm depends on the microbial species, environmental conditions, and the specific materials colonized. The aim of this study is to analyze the effects of factors such as temperature, incubation time, and initial cell concentration on biofilm formation by pathogenic bacteria isolated from human milk on model hydrophobic polystyrene surfaces. Model studies confirm that pathogenic bacteria appearing in human milk as a result of cross-contamination tend to form a biofilm. The majority of isolates formed biofilm at both 25 and 37 °C after 12 h at 1×10^3 CFU/mL inoculum count. Multivariate principal component analysis (PCA) showed that at lower temperatures, biofilm formation by bacterial isolates was the main determinant of biofilm formation, other factors were less important; however, at 37 °C, time was a factor in biofilm formation. The model research performed underlines the importance of maintaining the proper hygiene of rooms, surfaces, and devices for expressing, storing, and preparing mothers' milk and powdered infant formula (PIF) in facilities responsible for feeding newborns and premature babies.

Keywords: bacterial biofilm; pathogen; breast milk; polystyrene; PCA



Citation: Gemba, M.; Rosiak, E.; Nowak-Życzyńska, Z.; Kałęcka, P.; Łodykowska, E.; Kołożyn-Krajewska, D. Factors Influencing Biofilm Formation by *Salmonella enterica* sv. Typhimurium, *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *Pantoea* spp., and *Bacillus* spp. Isolated from Human Milk Determined by PCA Analysis. *Foods* **2022**, *11*, 3862. <https://doi.org/10.3390/foods11233862>

Academic Editor: Gary Dykes

Received: 31 October 2022

Accepted: 22 November 2022

Published: 30 November 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

The presence of microflora in human milk is a result of the colonization of various organs, including the milk ducts, by select microorganisms. Sources of microflora include the transfer of the mother's intestinal bacteria via the intestinal-glandular route, as well as the transfer of the mother's skin microflora or the infant's mouth microflora during suckling [1,2]. Commensal microflora identified in human milk includes *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Propionibacterium*, *Sphingomonas*, and *Bradyrhizobiaceae* spp. These bacteria were isolated from all human milk samples, independent of the donor. In addition, the presence of the following microorganisms has been confirmed in human milk: *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Coprococcus*, *Faecalibacterium*, and *Roseburia* spp. [1,2].

Inappropriate hygiene during the handling of human milk and powdered infant formula (PIF) can result in infections in premature and newborn babies, and several cases of neonatal infections after human milk consumption have been reported. At least one infant was reported to have died in Australia (2015) and the USA (2016) as a result of a *Cronobacter sakazakii* infection contracted from a breast pump. Both cases indicate that poor

hygiene practices (such as insufficient washing and disinfection, reusing of utensils to prepare and store PIF and human milk, or non-sterile storage of human milk) can result in cross-contamination of human milk and transmission of pathogens to the infant [3–5]. Cases of neonatal infection with *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, and *Enterobacter cloacae*, due to ingestion of infected human milk, have also been reported in the literature [6–9]. At a Food and Agriculture Organization and a World Health Organization expert meeting in 2004, pathogenic bacteria associated with powdered infant formula were divided into three categories: category A, high causal relationship (*C. sakazakii* and *Salmonella enterica*); category B, a causal relationship is probable but not yet confirmed (*Pantoea agglomerans*, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter koseri*, *C. freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, and *E. cloacae*); category C, a causal relationship less probable or not yet demonstrated (*Bacillus cereus*, *Clostridium difficile*, *C. perfringens*, *C. botulinum*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes*) [10].

Many species and genera of the following bacteria have demonstrated the ability to produce biofilm on usable surfaces: *E. coli*, *C. sakazakii*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Proteus mirabilis*, *K. pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *L. monocytogenes*, *Streptococcus* spp., *Serratia* spp., and *Salmonella* spp. [11–19]. The biofilm adversely affects the ability to sanitize usable surfaces and can lead to cross-contamination of products. Cleaning and disinfectant treatments do not always prevent biofilm formation because disinfectants that are effective at removing plankton cells might not always remove biofilms [20,21]. The biofilm provides a physical barrier protecting bacteria from adverse environmental conditions. Biofilm-forming microorganisms show resistance to desiccation, the presence of antibiotics, heating, anaerobic conditions, and varying pH. Bacterial biofilm formation is a multi-step process involving four main phases: reversible adhesion, irreversible adhesion, maturation, and dispersion. The formation of biofilm depends on the microbial species, environmental conditions, and the specific materials colonized [22–28]. The first two phases of biofilm formation depend on the interaction of bacterial cell structure with the physico-chemical properties of the medium (such as hydrophobicity and electrostatic charge). Electrostatic, covalent carbon–carbon and hydrogen bonds are responsible for the adhesion process to the medium surface. These interactions allow bacterial cells to colonize surfaces such as plastics, metals, and glass [29]. Flagella, fimbriae, and curli are bacterial organelles that enable adhesion and biofilm formation. Flagella can affect the adhesion and biofilm formation of *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, and *P. fluorescens*, while Type 1 fimbriae are responsible for initial bacterial adhesion in *E. coli*, *S. enterica* serovar *Enteritidis*, and *K. pneumoniae* and Type 3 fimbriae facilitate adherence of *K. pneumoniae* to glass. The presence of curli increases the ability of some strains, such as *E. coli*, to produce biofilm [17,30–32].

Temperature is one of the most important environmental factors in biofilm formation, which is most commonly observed in the temperature range of 20–37 °C. Higher temperatures increase the bacterial growth rate and glycocalyx synthesis, which also affects the rate of biofilm production. However, there is greater curli expansion at 30 °C than at 37 °C, providing greater bacterial adhesion to the plastic surface. Microbial adhesion is also affected by the growth phase of the microorganisms, in that cells in the logarithmic growth phase adhere faster than cells in the stationary phase. Biofilm production is also affected by nutrient availability in the environment and low nutrient availability (such as an absence of glucose) has been reported to promote biofilm formation. The presence of phosphorus increases the hydrophobicity of bacterial cells and enhances their biofilm-forming capacity. The ability to form a biofilm layer is also enhanced by the presence of other microorganisms and some bacterial cells in pure cultures do not adhere [27,28,33–37].

In summary, bacteria enter milk during poor hygiene practices and can form a biofilm on surfaces that come into contact with human milk. Contamination of human milk by pathogenic bacteria can cause neonatal disease and the presence of a biofilm increases the risk of infections among newborns, as bacteria protected by biofilm are resistant to washing and disinfection processes. Biofilm formation is a complex process that depends on many environmental conditions. The aim of this study is to analyze the effect of factors such

as temperature, incubation time, and initial cell concentration on biofilm formation by pathogenic bacteria isolated from human milk on model hydrophobic polystyrene surfaces.

2. Materials and Methods

2.1. Material

Twelve human milk isolates, capable of growing on media and suitable for detection of *Cronobacter* spp. and reference strain *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544, were used.

2.2. Bacterial Isolates

The bacterial isolates were detected in human milk samples according to the procedure described in ISO 22964: 2017 (Microbiology of the food chain: horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.). DNA isolation of presumptive isolates was performed according to the manufacturer's instructions using the Extreme DNA Bacteria Kit (Blirt, Gdańsk, Poland).

2.3. Genus and Species Identification

Extracts of each strain were used to obtain sequences encoding 16S rRNA mitochondrial DNA (mtDNA). A fragment of mitochondrial DNA approximately 1400 nucleotides long was amplified using primers described by Berthold-Pluta et al. (2017) [38]. Amplification conditions were as follows: Initial denaturation for 4 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 60 °C, and 45 s at 72 °C. The final extension step consisted of 15 min at 72 °C. The final amplification volume of 50 µL contained 25 µL of Perpetual OptiTaQ PCR Master Mix (2x) (EurX, Gdańsk, Poland) and 2.0 µM of each primer. The clean-up reaction of PCR products before sequencing was performed using a PCR/DNA Clean-Up Purification Kit (EurX, Poland), in line with the manufacturer's protocol. The sequencing of PCR products was performed using a BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in a volume of 10 µL, with purification entailing a BigDye Xterminator™ Purification Kit (Thermo Fisher Scientific). The electrophoresis was carried out in an ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). DNA sequence chromatograms were analyzed using Mega 7.0.21 [39]. The fragments were sequenced twice with both light- and heavy-stranded primers. The sequences were aligned using BioEdit software v.7.0.5.3 (Manchester, UK) and alignments were checked manually. Finally, the consensus sequences of 16S rRNA were compared with NCBI database, using nucleotide BLAST.

2.4. Variants of Experiments

Overnight cultures of bacterial isolates were incubated in brain heart infusion broth (BHI) (Neogen, Warsaw, Poland) at 37.0 °C. Target inoculum concentrations of the cultures were reached by diluting the overnight culture up to 10^{-7} CFU/mL/mL and obtaining the following densities of bacterial cells: small (S), 1×10^2 CFU/mL; medium (M), 1×10^3 CFU/mL; large (L), 1×10^6 CFU/mL. The inoculum density was checked by surface plating by dilutions in the range of 10^{-5} – 10^{-7} . The sixty variations of conditions influencing biofilm production were carried out for each isolate. Each set of variables in the experiment was coded according to the following scheme: inoculum count (S, M, L)_time [h] (8, 12, 24, 48, 96) temperature [°C] (4.0, 25.0, 37.0, 62.5) (Figure 1).

2.5. Surface Material and Preparation

Biofilm production was tested on polystyrene surfaces (Nest Scientific Biotechnology, Wuxi, China). Sterile polystyrene 96-well (type F) microplates were used for adherent culture. The following temperatures were applied: 62.5 °C (temperature for Holder Pasteurization of human milk); 37.0 °C (human body temperature); 25.0 °C; 4.0 °C (typical temperature for human milk storage in room/cooling conditions).

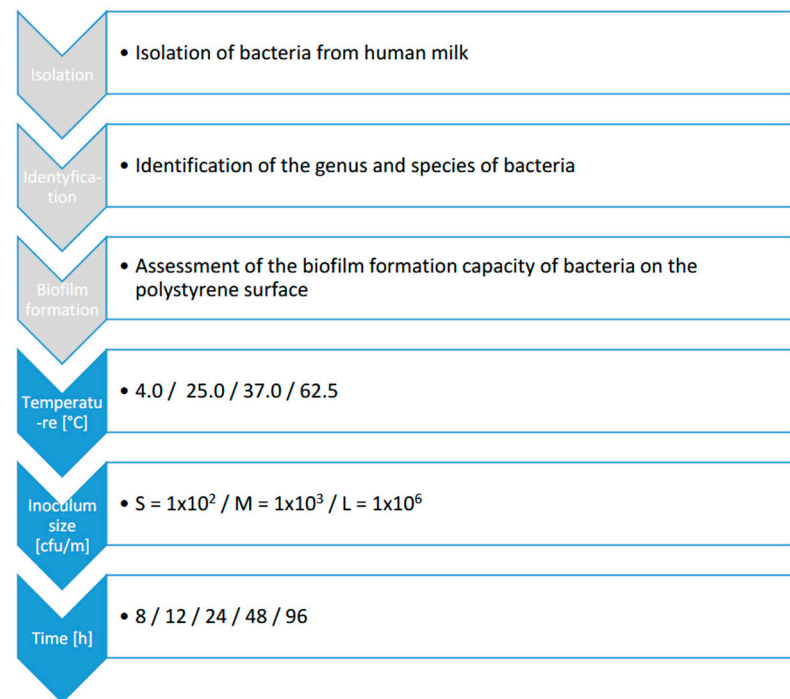


Figure 1. Research scheme.

2.6. Biofilm Formation on Hydrophobic Material (Polystyrene)

For biofilm formation in microplates, the bacterial strains were grown on BHI broth as described above. Three wells of sterile 96-well polystyrene plates were filled with 200 μ L of bacterial suspension. Negative control wells contained BHI broth only. The plates were covered and incubated for 8, 12, 18, 24, 48, and 96 h (only in the case of incubation at a temperature of 4.0 $^{\circ}$ C was the time extended to 96 h). Additionally, 20 μ L of bacterial suspension were transferred to three wells of another sterile 96-well polystyrene plate containing 180 μ L of BHI broth and incubated at 4.0, 25.0, 37.0, and 62.5 $^{\circ}$ C for 24 h to assess the ability of the isolates to grow. The cell concentration was determined spectrophotometrically by measuring the absorbance at 600 nm in relation to the blank (BHI broth). The content of each plate was then removed, rinsed six times with water, and air-dried for 45 min. Once dry, the plates were stained with 200 μ L of 1.0% crystal violet (Analab, Warsaw, Poland) for 30 min. Then, the content of each plate was removed, rinsed six times with running tap water, and air-dried for 45 min. The crystal violet bound to the biofilm was dissolved with 200 μ L of 96% ethanol (Poch, Gliwice, Poland) for 10 min. From each well, 150 μ L was added to a new sterile 96-well polystyrene plate, and absorbance was determined at 600 nm by a microplate reader (SoftMax Pro, San Jose, CA, USA). The cut-off optical density (OD_c) for the plate test was defined as three standard deviations above the mean OD of the negative control and strains were classified as follows: non-adherent (–) OD₆₀₀ < OD_c; weak (+) OD_c < OD₆₀₀ < 2 $\times$ OD_c; moderate (++) 2 $\times$ OD_c < OD₆₀₀ < 4 $\times$ OD_c; strong (+++) 4 $\times$ OD_c < OD₆₀₀. The assay was repeated in triplicate, in two separate experiments for each strain, and the results were averaged.

In order to determine the differences in the degree of biofilm formation between bacterial isolates in response to temperature, inoculum size, and time, the Pearson Chi² test was used. The Spearman rank test was used to assess the strength of the relationship between the variables. The differences in biofilm formation were considered statistically significant at $p \leq 0.05$ for all tests. Statistica 13.3 PL software (TIBCO Software Inc., San Francisco, CA USA) was used to perform the multidimensional principal component analysis (PCA) to select the surface-inoculum count-time-temperature variant most favorable for biofilm formation and to determine the correlation coefficient between components and inoculum count-time-temperature variants.

3. Results

3.1. Identification of Bacterial Isolates of Humane Milk

Based on the sequencing of the 16s rRNA, the following genera and species of isolates were identified: *Klebsiella* spp. (no. 1–5), *Bacillus* spp. (no. 1) *Pantoea* spp. (no. 1), *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* (no. 1), *Enterobacter hormaechei* (no. 1 and 2), and *E. cloacae* (no. 1 and 2).

3.2. Evaluation of Biofilm Formation on a Hydrophobic Surface

On the hydrophobic polystyrene surface, isolates of bacterial strains did not form biofilm at 4.0 °C and 62.5 °C during the experimental period of 8–96 h (Table 1). At 25.0 °C, *Pantoea* spp., *S. enterica* sv. *Typhimurium*, and *E. cloacae* 1 did not form biofilm at 8–48 h. After 8 h of incubation at 25.0 °C, none of the isolates nor the reference strain *C. sakazakii* ATCC 29544 formed biofilm, regardless of the inoculum concentration. Isolates of *Klebsiella* spp. no. 2 and 4 also did not form biofilm after 12 h of incubation. A strong biofilm was formed at this temperature by *Bacillus* spp. (after 12 h of incubation), by *E. cloacae* no. 2 (regardless of inoculum concentration), and by *Klebsiella* spp. 1 (S and M inoculum size). After 48 h of incubation, only the *E. cloacae* strain 2 formed a very strong biofilm at 25.0 °C.

Table 1. Biofilm formation on the hydrophobic surface as a result of various combinations of inoculum size, time, and incubation temperature.

Isolate	Inoculum Count [CFU/mL]	Temperature 25.0 °C						Temperature 37.0 °C			
		Growth 48 h	Time of Biofilm Formation [h]				Growth 48 h	Time of Biofilm Formation [h]			
			8 h	12 h	24 h	48 h		8 h	12 h	24 h	48 h
<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 25944	S	+	-	-	+	+	+	-	++	-	-
	M	+	-	+	++	+	+	-	++	-	+
	L	+	-	+	++	-	+	-	++	+	+
<i>Klebsiella</i> spp. 1	S	+	-	+++	++	++	+	+++	+++	+++	+++
	M	+	-	+++	++	-	+	-	+++	+++	++
	L	+	-	+	++	-	+	-	+++	+++	++
<i>Klebsiella</i> spp. 2	S	+	-	-	+	++	+	-	-	-	+
	M	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
	L	+	-	-	-	-	+	-	++	+++	+
<i>Klebsiella</i> spp 3	S	+	-	-	-	-	+	-	+++	++	++
	M	+	-	+	+++	-	+	+	+++	+++	++
	L	+	-	-	++	-	+	-	+	++	++
<i>Klebsiella</i> spp. 4	S	+	-	-	-	-	+	-	+++	+	+
	M	+	-	-	++	+	+	-	+++	++	+
	L	+	-	-	+	-	+	+++	++	+	+
<i>Klebsiella</i> spp. 5	S	+	-	-	+	++	+	-	++	++	+++
	M	+	-	+++	++	-	+	++	+++	+++	+++
	L	+	-	+	++	-	+	-	+++	+++	++
<i>Bacillus</i> spp.	S	+	-	+++	-	-	+	+++	+++	+++	+++
	M	+	-	+++	-	-	+	+++	+++	+++	+++
	L	+	-	+++	+	+	+	+++	+++	+++	+++

Table 1. Cont.

Isolate	Inoculum Count [CFU/mL]	Temperature 25.0 °C						Temperature 37.0 °C			
		Growth 48 h	Time of Biofilm Formation [h]				Growth 48 h	Time of Biofilm Formation [h]			
			8 h	12 h	24 h	48 h		8 h	12 h	24 h	48 h
<i>Pantoea</i> spp.	S	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
	M	+	-	-	-	-	+	++	++	-	-
	L	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> sv. <i>Typhimurium</i>	S	+	-	-	-	-	+	+++	+++	+	+
	M	+	-	-	-	-	+	+	+++	+	+
	L	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter hormaechei</i> 1	S	+	-	+	+	+	+	+	++	+	++
	M	+	-	++	++	++	+	+	+++	+	++
	L	+	-	++	+	-	+	++	++	+	++
<i>Enterobacter hormaechei</i> 2	S	+	-	+	-	-	+	+	+	+	++
	M	+	-	+	+	-	+	++	++	++	++
	L	+	-	+	+	-	+	++	+	+	+++
<i>Enterobacter cloacae</i> 1	S	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	M	+	-	-	-	-	+	+	-	++	-
	L	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> 2	S	+	-	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++
	M	+	-	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++
	L	+	-	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++

- no biofilm; + weak; ++ moderate; +++ strong.

At 37.0 °C, *Bacillus* spp., *E. cloacae* no. 2, and *Klebsiella* spp. no. 1, no. 3, and no. 5 formed the strongest biofilms, regardless of inoculum concentration. It was observed that isolates that did not produce a biofilm (*Pantoea* spp., *S. enterica* sv. *Typhimurium*, and *E. cloacae* no. 1) or produced weak biofilm (*Klebsiella* spp. 2) at 25.0 °C also produced a weaker biofilm at 37.0 °C (Table 1).

At 37.0 °C, two strains showed a reduction in biofilm formation, while three strains at 37.0 °C produced more biofilm. The reference strain *C. sakazakii* formed a medium biofilm at 25.0 °C after 24 h of incubation at medium and high inoculum counts, while at 37.0 °C it formed a moderate biofilm after 12 h regardless of inoculum concentration. Under other conditions, it formed weak or no biofilm. Strong biofilm was formed by the other tested bacterial strains after 12 h of incubation.

At 25.0 °C and after 8 h of incubation, none of the analyzed bacterial isolates nor the *C. sakazakii* strain formed biofilm on a polystyrene surface. At low inoculum counts (S), no biofilm formation was observed in 58% of the isolates at up to 48 h. Medium and large inoculum (M and L) increased the percentage of strains forming biofilm within 24 h of incubation, while after 48 h of incubation, 75% and 83% of strains, respectively, no longer formed biofilm. Most of the isolates formed a strong biofilm after 12 h of incubation at an M inoculum count (Table 2).

Moderate biofilm was produced by isolates after 24 h of incubation with M inoculum count, while weak biofilms of isolates were most prolific after 24 h with S and L inoculum. At 25.0 °C, the classification of biofilm strength was not significantly influenced by inoculum density. There was also no correlation between inoculum density and biofilm strength at the time of its formation (Table 2).

Table 2. Quantitative biofilm formation by tested bacterial isolates and *C. sakazakii* [%], dependent on incubation time and inoculum count.

Temperature [° C]	Inoculum Count [CFU/mL]	Biofilm Classification	Time [h]				
			8	12	24	48	
25.0	S	no	100%	58%	58%	58%	
25.0		weak	0	17%	25%	8%	
25.0		moderate	0	0%	8%	25%	
25.0		strong	0	25%	8%	8%	
25.0	M	no	100%	42%	42%	75%	
25.0		weak	0	17%	8%	8%	
25.0		moderate	0	8%	33%	8%	
25.0		strong	0	33%	17%	8%	
25.0	L	no	100%	50%	33%	83%	
25.0		weak	0	25%	33%	8%	
25.0		moderate	0	8%	25%	0	
25.0		strong	0	17%	8%	8%	
			Chi²	0.000000 <i>p</i> = 1.0000	2.285714 <i>p</i> = 0.89164	4.875000 <i>p</i> = 0.55994	4.038462 <i>p</i> = 0.67147
			R rank Spearman	-	0.0248283 <i>p</i> = 0.88571	0.1805556 <i>p</i> = 0.29198	−0.224370 <i>p</i> = 0.18832
37.0	S	no	50%	27%	25%	8%	
37.0		weak	17%	9%	33%	33%	
37.0		moderate	0	18%	17%	25%	
37.0		strong	33%	45%	25%	33%	
37.0	M	no	17%	17%	8%	25%	
37.0		weak	42%	0%	25%	17%	
37.0		moderate	25%	17%	25%	33%	
37.0		strong	17%	67%	42%	25%	
37.0	L	no	50%	17%	17%	8%	
37.0		weak	8%	25%	33%	33%	
37.0		moderate	17%	25%	8%	33%	
37.0		strong	25%	33%	42%	25%	
			Chi²	9.002381 <i>P</i> = 0.17344	5.421680 <i>p</i> = 0.049097	2.797203 <i>p</i> = 0.83384	2.781818 <i>p</i> = 0.83569
			R rank Spearman	−0.001714 <i>P</i> = 0.99208	−0.059207 <i>p</i> = 0.73548	0.1231952 <i>p</i> = 0.47410	−0.035722 <i>P</i> = 0.83614

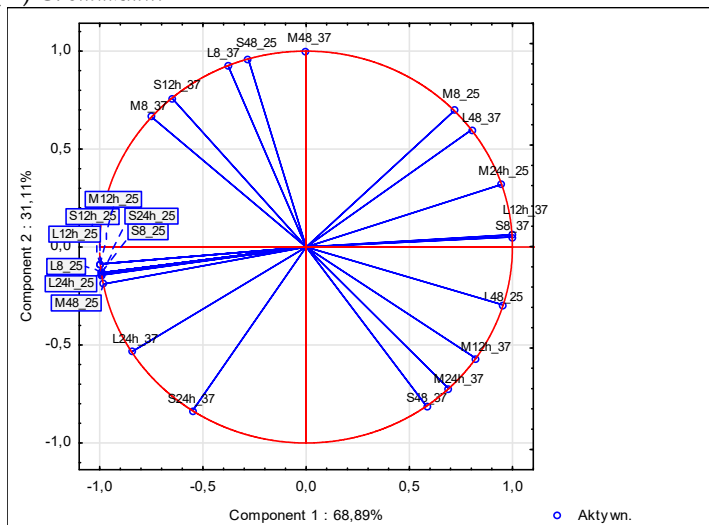
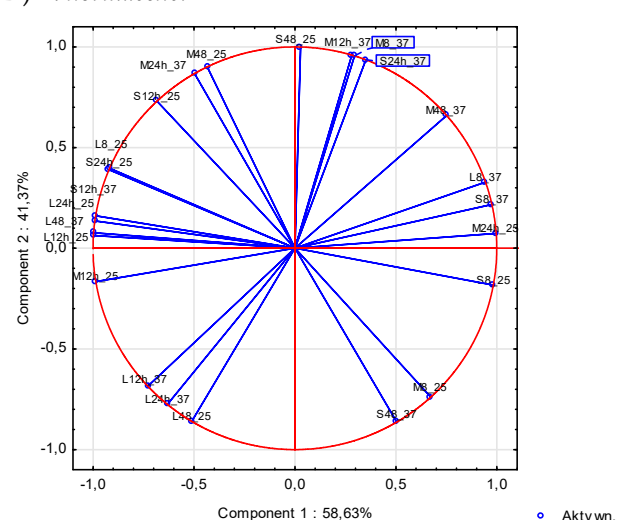
At 37.0 °C, after 8 h of incubation (as opposed to 25.0 °C where bacteria did not form a biofilm), biofilm was formed by 50–58% of the tested bacteria and the percentage of strains not producing biofilm decreased during the 8–48 h incubation period. This indicates a statistically significant influence of temperature and individual characteristics of the tested species of bacteria on biofilm formation within 12–48 h (Table 3, $p \leq 0.05$). After 12 h of incubation, the tested bacteria formed the strongest biofilm, regardless of the inoculum density. The observed differences in biofilm classification after 12 h of incubation were significantly different (Table 2). There was a tendency for weak biofilm formation after the longer incubation times of 24 and 48 h in the cases of the S and L inoculation size. In contrast, the bacterial inoculum of M-concentration favored the production of weak biofilm after 8 h.

Table 3. Influence of temperature and time on biofilm formation by tested bacterial isolates.

		Chi ² and <i>p</i> -Value; <i>p</i> ≤ 0.05			
Temperature [°C]		Time [h]			
		8	12	24	48
25.0	37.0	0.000000 <i>p</i> = 1.0000	218.36368 <i>p</i> = 0.03118	217.57780 <i>p</i> = 0.04040	211.80490 <i>p</i> = 0.22453
Isolates		Temperature [°C]			
		25.0	37.0	25.0	37.0
		0.000000 <i>p</i> = 1.0000	50.80000 <i>p</i> = 0.02460	74.2857 <i>p</i> = 0.00005	53.97059 <i>p</i> = 0.01207
		64.50000 <i>p</i> = 0.00084	67.91608 <i>p</i> = 0.00033	54.46154 <i>p</i> = 0.01076	79.85455 <i>p</i> = 0.00001

3.3. Analysis of Factors Determining Biofilm Formation

A multidimensional principal component analysis is one of several techniques used to reduce the multidimensionality of variables. In the experiments conducted for the purpose of this study, each observation was the result of the influence of several variables (incubation time, inoculum size, and temperature). PCA is a statistical procedure to reduce the number of variables, detect, and verify structure and regularity in the relationships between variables. In the case of 53.8% of the tested bacterial isolates, the variables selected for the experiment explained 100% of the biofilm formation. For the remaining 46.2% of isolates, variability in biofilm formation is determined by two principal components (Figure 2). The strength of the compound between the components and the variables is expressed by the values of the correlation coefficients (Figure 2). The orthogonal axes of the graphs show the principal components determining biofilm formation by the tested bacterial strains and the *C. sakazakii* ATCC 29544 reference strain. The correlation circle determines the maximum value of the correlation between the variables and components 1 and 2. The points marked on the graph correspond to the factor loadings (correlations) between the variables and the principal components. The length of the directional vectors connecting the points corresponding to the variables with the origin of the coordinate system is proportional to the strength of the correlation of the variable with the component. All the obtained results take correlations (factor loadings) close to unity, so the points are very close to the unit circle, with the exception of three variable systems (S_8h, S_24h, and L_24h), for which the first two components explained 82, 78, and 80%, respectively, of the variation in biofilm formation by *S. enterica* sv. *Typhimurium* at 37.0 °C (Table 4 and Figure 2).

(A) *C. sakazakii***(D)** *E. hormaechei* 2**Figure 2.** Cont.

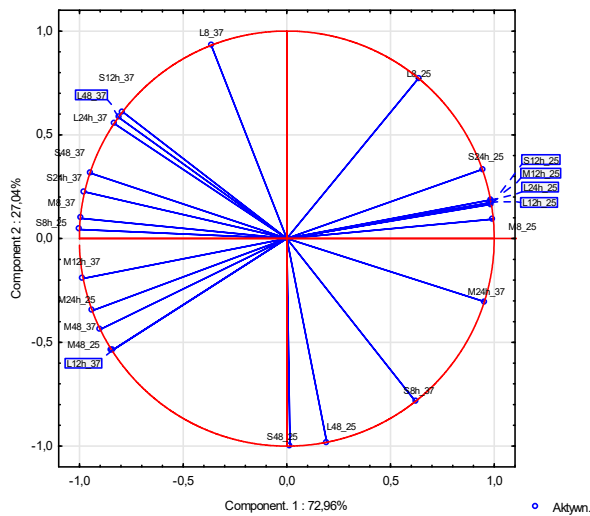
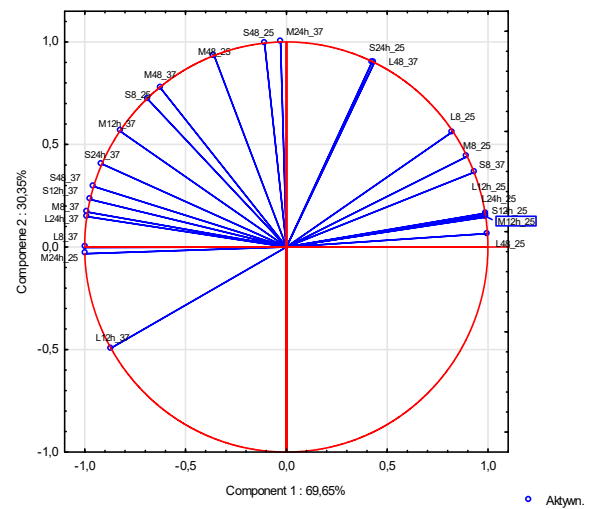
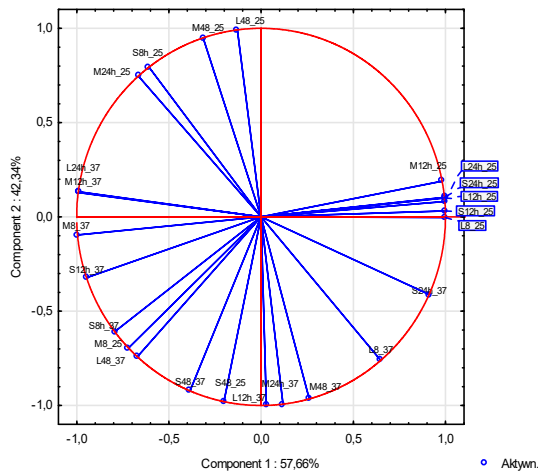
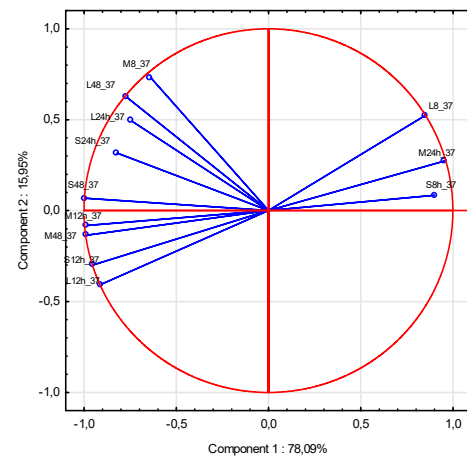
(B) *Bacillus* spp.(E) *E. cloacae*(C) *Klebsiella* 3(F) *S. enterica* sv. *Typhimurium*

Figure 2. Principal component analysis of the conditions of biofilm formation on the surface by the tested bacterial isolates (A–F). S, M, and L: inoculum count; 8, 12, and 24: time of incubation [h].

The angle between the vectors reflects the similarity of the effect of the variables on components 1 and 2 and the strength of the compound between the variables (Figure 2). The extracted component number 1 largely explained the conditions of biofilm formation by the tested bacterial strains (*C. sakazakii*, *Bacillus* spp., and *S. enterica* sv. *Typhimurium*). Two-dimensional planes spanning two principal component axes explained 100% of the variability in response to 24 sets of variables, representing conditions affecting biofilm formation by the 11 bacterial isolates tested and the reference strain (Table 4). In the case of *S. enterica* sv. *Typhimurium*, three components were isolated, explaining 78.09%, 15.95%, and 5.95% of the variation in biofilm formation, respectively. The number of principal components was reduced and the first two components were accepted to explain 94.04% of the conditions for biofilm formation by *S. enterica* sv. *Typhimurium*.

Table 4. Determination coefficient values of R^2 explaining the % variation in biofilm formation factors by principal components.

Variables	<i>C. sakazakii</i>		<i>Bacillus</i> spp.		<i>Klebsiella</i> spp. 3		<i>E. hormaechei</i> 2		<i>E. cloacae</i> 2		<i>Salmonella</i> ent. Typh.	
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
S_8h_25	0.98	0.02	0.98	0.02	0.37	0.63	0.97	0.03	0.48	0.52	n.d.	n.d.
S_12h_25	0.99	0.01	0.99	0.01	1.00	0.00	0.47	0.53	0.97	0.03	n.d.	n.d.
S_24h_25	0.98	0.02	0.98	0.02	0.99	0.01	0.85	0.15	0.18	0.82	n.d.	n.d.
S_48h_25	0.08	0.92	0.08	0.92	0.04	0.96	0.00	1.00	0.01	0.99	n.d.	n.d.
M_8h_25	0.52	0.48	0.52	0.48	0.52	0.48	0.45	0.55	0.80	0.20	n.d.	n.d.
M_12h_25	0.99	0.01	0.99	0.01	0.96	0.04	0.97	0.03	0.98	0.02	n.d.	n.d.
M_24h_25	0.90	0.10	0.90	0.10	0.44	0.56	0.99	0.01	1.00	0.00	n.d.	n.d.
M_48h_25	0.96	0.04	0.96	0.04	0.10	0.90	0.19	0.81	0.13	0.87	n.d.	n.d.
L_8h_25	0.98	0.02	0.98	0.02	1.00	0.00	0.84	0.16	0.68	0.32	n.d.	n.d.
L_12h_25	0.98	0.02	0.98	0.02	0.99	0.01	1.00	0.00	0.98	0.02	n.d.	n.d.
L_24h_25	0.98	0.02	0.98	0.02	0.99	0.01	0.97	0.03	0.98	0.02	n.d.	n.d.
L_48h_25	0.91	0.09	0.91	0.09	0.02	0.98	0.26	0.74	1.00	0.00	n.d.	n.d.
S_8h_37	1.00	0.00	1.00	0.00	0.63	0.37	0.95	0.05	0.87	0.13	0.81	0.82
S_12h_37	0.42	0.58	0.42	0.58	0.90	0.10	0.98	0.02	0.95	0.05	0.91	1.00
S_24h_37	0.30	0.70	0.30	0.70	0.83	0.17	0.12	0.88	0.84	0.16	0.68	0.78
S_48h_37	0.34	0.66	0.34	0.66	0.15	0.85	0.25	0.75	0.91	0.09	0.99	1.00
M_8h_37	0.56	0.44	0.56	0.44	0.99	0.01	0.09	0.91	0.97	0.03	0.41	0.95
M_12h_37	0.68	0.32	0.68	0.32	0.98	0.02	0.08	0.92	0.68	0.32	0.98	0.98
M_24h_37	0.48	0.52	0.48	0.52	0.01	0.99	0.25	0.75	0.00	1.00	0.91	0.98
M_48h_37	0.00	1.00	0.00	1.00	0.07	0.93	0.56	0.44	0.39	0.61	0.98	1.00
L_8h_37	0.14	0.86	0.14	0.86	0.42	0.58	0.89	0.11	1.00	0.00	0.72	0.99
L_12h_37	1.00	0.00	1.00	0.00	0.00	1.00	0.53	0.47	0.76	0.24	0.83	1.00
L_24h_37	0.71	0.29	0.71	0.29	0.98	0.02	0.40	0.60	0.98	0.02	0.55	0.80
L_48h_37	0.64	0.36	0.64	0.36	0.45	0.55	0.99	0.01	0.19	0.81	0.60	0.99

n.d.—not detectable biofilm; C1: component 1; C2: component 2.

4. Discussion

Human milk may be contaminated with *Klebsiella* spp., *Bacillus* spp., *Pantoea* spp., *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium*, *E. hormaechei*, or *E. cloacae*; these bacteria can infect newborns. The literature reports cases of infection in newborns with *K. pneumoniae*, *B. cereus*, and *E. cloacae* bacteria caused by the consumption of contaminated human milk [6–9,40,41].

The isolated bacteria have the ability to produce a biofilm. This study looked at the factors contributing to biofilm formation. Time, temperature, type, and species of bacteria as well as inoculum concentration were analyzed. At temperatures 4 and 62.5 °C, the isolates did not produce biofilm; however, most of the isolates showed growth at 62.5 °C after 8 h of incubation. Fakruddin et al. (2014) showed that the D_{62} value for *C. sakazakii* isolates ranged from 0.57 to 1.12 min [42]. Morgan et al. (1988) determined the predicted D_{60} value for *K. pneumoniae* isolates to be 0.022 min. The inactivation of 90% of the bacterial population at 62.5 °C prevented the formation of biofilm in the tested isolates [43].

The tested bacteria isolates tend to form a biofilm at 25 °C and 37 °C. However, some isolates may show poor adaptation to adhesion and biofilm formation. They did not produce a biofilm at the temperatures of 25 °C and 37 °C (*Pantoea* spp., *S. enterica*

sv. *Typhimurium*, and *E. cloacae* no. 1) or produce a weak biofilm (*Klebsiella* spp. no. 2). Piras et al. (2015) showed that *S. enterica* strains, after overnight incubation, showed higher biofilm production at 22 °C than at 35.0 °C [35]. Stepanović et al. (2003) also observed higher biofilm production by *Salmonella* spp. at 30.0 °C after 24 h of incubation and at 22.0 °C after 48 h of incubation than at 37.0 °C [33]. In the study by Buzoleva et al. (2018), they showed that *Pantoea* spp. produces a more potent biofilm at 37 °C than at 22 °C but within 72 h of incubation [44]. Korres et al. (2013) showed that *K. pneumoniae* forms a stronger biofilm after 24 h at 40 °C than at 35.0 °C [45]. Hošťacká et al. (2010) compared the biofilm production by *K. pneumoniae* strains at 30.0 °C and 37.0 °C (24 h incubation). Two of the five strains showed a decrease in biofilm production at 37.0 °C. For the other three tested strains, the temperature of 30 °C was conducive to greater biofilm production [46]; this may indicate the presence of individual mechanisms of biofilm production in the same species of bacteria. A similar relationship was observed in our study, where the production of biofilm by five *Klebsiella* strains, two *E. hormachei* strains, and two *E. cloacae* strains was assessed. In each case, for the same strain, differences in biofilm production were observed depending on time, temperature, and inoculum count. *E. cloacae* no. 1 produced a very weak biofilm compared to *E. cloacae* no. 2. In the study of Nyenje et al. (2013), they showed that *E. cloacae* readily form biofilm on plastic surfaces. It was found that long incubation times and high temperatures affect the production of biofilm. At 37 °C, the bacteria produced a stronger biofilm after 24 and 48 h of incubation [47]. In addition, Iversen et al. (2004) showed that a higher temperature promotes biofilm formation (>40 °C) [48]. In a proprietary study at both 25 °C and 37 °C, *E. cloacae* produced a strong biofilm, except when it was incubated at 25 °C for 8 h; which may indicate that prolonged incubation times at lower temperatures will result in biofilm formation. In addition to the temperature and time factors, the study showed that the individual characteristics of the strains significantly affect the production of biofilm. The ability to produce biofilm by *E. hormaechei* bacteria was confirmed by the studies of Liu et al. (2022) [49]. The differences in biofilm production by *B. cereus* depending on environmental factors have been described in numerous studies. In the study by Kown et al. (2017), they showed that at 30.0 °C, increasing the incubation time from 24 to 48 h on a BHI medium increased biofilm production by two of the eight tested *B. cereus* strains [50]. Hayrapetyan et al. (2015) showed that approximately 50% of food-isolated *B. cereus* strains produced more biofilm after 24 h than after 48 h of incubation [51]. In our studies, *B. cereus* produced an equally strong biofilm in both 24 h and 48 h of incubation (at 37.0 °C). In our research, *C. sakazakii* did not show any signs of strong biofilm formation at 25.0 and 37.0 °C; moreover, the length of the incubation time had no effect on biofilm formation. Similar results were obtained by Ye et al. (2015), where strains of *C. sakazakii* formed only a weak biofilm at 37.0 °C [52]. The optimal temperature conditions for the development of a biofilm cannot be unequivocally determined. With some strains, lowering the incubation temperature may reduce bacterial growth but promote biofilm production. Moreover, the production of curli and cellulose usually takes place at temperatures below 30 °C [34].

PCA analysis made it possible to identify the structure of variables responsible for biofilm formation and their location in a limited space defined by two components. In the case of *C. sakazakii*, the first component explains more than 90% of the variability in the conditions of biofilm formation at 25 °C. Therefore, C1 can be called “temperature”. The temperature of 37 °C promotes the formation of biofilm by mesophilic bacteria. It can be seen that the variation in biofilm formation is time-dependent for both the S, M, and L inoculum count. The second component can therefore be called biofilm formation time. A similar interpretation of the main components can also be applied to *Bacillus* spp., *E. cloacae*, and *Salmonella* spp. However, in the case of *E. hormaechei* no. 2 and *Klebsiella* no. 3, the interpretation of the component factors is not so clear.

5. Conclusions

In this experiment, biofilm formation by bacteria isolated from breast milk was studied, which depended on factors such as: type and species of bacteria, temperature, inoculum count, and incubation time. Incubation temperatures assessed in this study (4.0, 25.0, 37.0, and 62.5 °C) are important for the life cycle of the tested bacterial strains and in the human milk logistics chain (from donor to beneficent). Studies on modeling surfaces show that pathogenic bacteria appearing in human milk as a result of cross-contamination tend to form a biofilm only at 25.0 and 37.0 °C. The phenomenon of biofilm formation by pathogenic bacteria isolates present in breast milk is significantly dependent on the temperature and individual mechanisms of biofilm production of the strains of the same kind or species of bacteria. The majority of isolates formed biofilm at both 25.0 and 37.0 °C after 12 h at an M inoculum count. Bacteria forming a strong biofilm at 25 and 37 °C were: *Bacillus* spp., *E. cloacae* strain 2, and *Klebsiella* spp. strains no. 1, no. 3, and no. 5.

Multivariate PCA showed that at 25.0 °C the biofilm formation by bacterial isolates was determined mainly by temperature; other factors such as inoculum size (three factors) and time (five factors) were less important. However, at 37.0 °C, time was the main factor in biofilm formation. From a safety point of view, it is extremely important to maintain proper hygiene and temperatures of rooms, surfaces, and equipment used for the pumping, storing, and preparation of human breast milk and PIF in institutions responsible for feeding newborns and premature babies. Performing hygienic activities can be supported by quality and safety assurance systems resulting from Codex Alimentarius, EU regulations, and ISO standards (9001:2016, 22 000:2018).

Author Contributions: Conceptualization, E.R. and M.G.; methodology, E.R. and Z.N.-Ż.; formal analysis, P.K., Z.N.-Ż., M.G. and E.L.; investigation, E.R.; resources, M.G.; data curation, E.R.; writing—original draft preparation, E.R. and M.G.; writing—review and editing, D.K.-K.; visualization, E.R.; funding acquisition, E.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

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

References

1. Gomez-Gallego, C.; Garcia-Mantrana, I.; Salminen, S.; Collado, M.C. The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity. *Semin. Fetal Neonatal Med.* **2016**, *21*, 400–405. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Fernández, L.; Langa, S.; Martín, V.; Maldonado, A.; Jiménez, E.; Martín, R.; Rodríguez, J.M. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol. Res.* **2013**, *69*, 1–10. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Bowen, A.; Wiesenfeld, H.C.; Kloesz, J.L.; Pasculle, A.W.; Nowalk, A.J.; Brink, L.; Elliot, E.; Martin, H.; Tarr, C.L. Notes from the field: *Cronobacter sakazakii* infection associated with feeding extrinsically contaminated expressed human milk to a premature infant—Pennsylvania, 2016. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2017**, *66*, 761–762. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Sundararajan, M.; Enane, L.A.; Kidwell, L.A.; Gentry, R.; Danao, S.; Bhumbra, S.; Lehmann, C.; Teachout, M.; Yeadon-Fagbohun, J.; Krombach, P.; et al. Notes from the field: *Cronobacter sakazakii* meningitis in a full-term neonate fed exclusively with breast milk—Indiana, 2018. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2018**, *67*, 12–48. [\[CrossRef\]](#)
5. McMullan, R.; Menon, V.; Beukers, A.G.; Jensen, S.O.; van Hal, S.J.; Davis, R. *Cronobacter sakazakii* infection from expressed breast milk, Australia. *Emerg. Inf. Dis.* **2018**, *24*, 393–394. [\[CrossRef\]](#)
6. Pawlik, D.; Chmielarczyk, A.; Lorenc, K.; Michalski, P.; Lauterbach, J.; Radziszewska, R.; Wójkowska-Mach, J. *Klebsiella pneumoniae* in breast milk—A cause of sepsis in neonate. *Arch. Med.* **2017**, *9*, 1–6. [\[CrossRef\]](#)
7. Cormontagne, D.; Rigourd, V.; Vidic, J.; Rizzotto, F.; Bille, E.; Ramarao, N. *Bacillus cereus* Induces Severe Infections in Preterm Neonates: Implication at the Hospital and Human Milk Bank Level. *Toxins* **2021**, *13*, 123. [\[CrossRef\]](#)
8. Decousser, J.W.; Ramarao, N.; Dupont, C.; Dorval, M.; Bourgeois-Nicolaos, N.; Guinebreière, M.H.; Razafumahefa, H.; Doucet-Populaire, F. *Bacillus cereus* and severe intestinal infections in preterm neonates: Putative role of pooled breast milk. *Am. J. Infect. Control* **2013**, *41*, 918–921. [\[CrossRef\]](#)
9. Weems, M.F.; Dereddy, N.R.; Arnold, S.R. Mother's Milk as a Source of *Enterobacter cloacae* Sepsis in a Preterm. *Infant. Breastfeed. Med.* **2015**, *10*, 503–504. [\[CrossRef\]](#)
10. Food Agricultural Organization; World Health Organization. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula. In *Meeting Report Microbiological Risk Assessment 6*; WHO: Geneva, Switzerland, 2004.

11. Doijad, S.P.; Barbuddhe, S.B.; Garg, S.; Poharkar, K.V.; Kalorey, D.R.; Kurkure, N.V.; Rawool, D.B.; Chakraborty, T. Biofilm-forming abilities of *Listeria monocytogenes* serotypes isolated from different sources. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0137046. [\[CrossRef\]](#)
12. Allsopp, L.P.; Beloin, C.; Ulett, G.C.; Valle, J.; Totsika, M.; Sherlock, O.; Ghigo, J.M.; Schembri, M.A. Molecular Characterization of UpaB and UpaC, Two New Autotransporter Proteins of Uropathogenic *Escherichia coli* CFT073. *Infect. Immun.* **2012**, *80*, 321–332. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Patel, J.; Sharma, M. Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars to cabbage and lettuce leaves. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *139*, 41–47. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Hurrell, E.; Kucerova, E.; Loughlin, M.; Caubilla-Barron, J.; Forsythe, S.J. Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* serovars and other Enterobacteriaceae. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *136*, 227–231. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Iversen, C.; Forsythe, S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci. Technol.* **2003**, *14*, 443–454. [\[CrossRef\]](#)
16. Kim, U.; Kim, J.H.; Oh, S.W. Review of multi-species biofilm formation from foodborne pathogens: Multi-species biofilms and removal methodology. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**, *62*, 5783–5793. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Carrascosa, C.; Raheem, D.; Ramos, F.; Saraiva, A.; Raposo, A. Microbial Biofilms in the Food Industry—A Comprehensive Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 2014. [\[CrossRef\]](#)
18. Lamas, A.; Regal, P.; Vázquez, B.; Miranda, J.M.; Cepeda, A.; Franco, C.M. *Salmonella* and *Campylobacter* biofilm formation: A comparative assessment from farm to fork. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *98*, 4014–4032. [\[CrossRef\]](#)
19. Liu, Y.; Zhang, J.; Ji, Y. Environmental factors modulate biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Sci. Prog.* **2020**, *103*, 0036850419898659. [\[CrossRef\]](#)
20. López-Gálvez, F.; Gil, M.I.; Truchado, P.; Selma, M.V.; Allende, A. Cross-contamination of fresh-cut lettuce after a short-term exposure during pre-washing cannot be controlled after subsequent washing with chlorine dioxide or sodium hypochlorite. *Food Microbiol.* **2010**, *27*, 199–204. [\[CrossRef\]](#)
21. Bridier, A.; Sanchez-Vizuet, P.; Guilbaud, M.; Piard, J.C.; Naitali, M.; Briand, R. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiol.* **2015**, *45*, 167–178. [\[CrossRef\]](#)
22. Gupta, T.B.; Mowat, E.; Brightwell, G.; Flint, S.H. Biofilm formation and genetic characterization of New Zealand *Cronobacter* isolates. *J. Food Saf.* **2018**, *38*, e12430. [\[CrossRef\]](#)
23. Nguyen, D.; Joshi-Datar, A.; Lepine, F.; Bauerle, E.; Olakanmi, O.; Beer, K.; McKay, G.; Siehnel, R.; Schafhauser, J.; Wang, J.; et al. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science* **2011**, *334*, 982–986. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Espinal, P.; Marti, S.; Vila, J. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J. Hosp. Infect.* **2012**, *80*, 56–60. [\[CrossRef\]](#)
25. Hayrapetyan, H.; Abee, T.; Groot, M.N. Sporulation dynamics and spore heat resistance in wet and dry biofilms of *Bacillus cereus*. *Food Control* **2016**, *60*, 493–499. [\[CrossRef\]](#)
26. Vuotto, C.; Longo, F.; Pascolini, C.; Donelli, G.; Balice, M.P.; Libori, M.F.; Tiracchia, V.; Salvia, A.; Varaldo, P.E. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *J. Appl. Microbiol.* **2017**, *123*, 1003–1018. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Yan, J.; Bassler, B.L. Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. *Cell Host Microbe* **2019**, *26*, 15–21. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Zhu, T.; Yang, C.; Bao, X.; Chen, F.; Guo, X. Strategies for controlling biofilm formation in food industry. *Grain Oil Sci. Technol.* **2022**, 1–14. [\[CrossRef\]](#)
29. Bordin, C.; de Bentzmann, S. Hacking into bacterial biofilms: A new therapeutic challenge. *Ann. Intensive Care* **2011**, *1*, 1–8. [\[CrossRef\]](#)
30. Ryu, J.H.; Kim, H.; Frank, J.F.; Beuchat, L.R. Attachment and biofilm formation on stainless steel by *Escherichia coli* O157: H7 as affected by curli production. *Lett. Appl. Microbiol.* **2004**, *39*, 359–362. [\[CrossRef\]](#)
31. Dula, S.; Ajayeoba, T.A.; Ijabadeniyi, O.A. Bacterial biofilm formation on stainless steel in the food processing environment and its health implications. *Folia Microbiol.* **2021**, *66*, 293–302. [\[CrossRef\]](#)
32. Touthik, S.H.; Park, J.-H.; Kim, K.; Ashrafudoulla; Ulrich, M.S.I.; Mizan, F.R.; Roy, P.K.; Shim, W.-B.; Kim, Y.-M.; Park, S.H.; et al. Antibiofilm efficacy of *Leuconostoc mesenteroides* J.27-derived postbiotic and food-grade essential oils against *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli* alone and in combination, and their application as a green preservative in the seafood industry. *Food Res. Int.* **2022**, *156*, 111163. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Stepanović, S.; Ćirković, I.; Mijač, V.; Švabić-Vlahović, M. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiol.* **2003**, *20*, 339–343. [\[CrossRef\]](#)
34. De Oliveira, D.C.V.; Fernandes Junior, A.; Kaneno, R.; Silva, M.G.; Araujo Junior, J.P.; Silva, N.C.C.; Rall, V.L.M. Ability of *Salmonella* spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material. *Foodborne Pathog. Dis.* **2014**, *11*, 478–483. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Piras, F.; Fois, F.; Consolati, S.G.; Mazza, R.; Mazzette, R. Influence of temperature, source, and serotype on biofilm formation of *Salmonella enterica* isolates from pig slaughterhouses. *J. Food Protect.* **2015**, *78*, 1875–1878. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Borges, K.A.; Furian, T.Q.; Souza, S.N.; Menezes, R.; Tondo, E.C.; Salle, C.T.; Moraes, H.L.; Nascimento, V.P. Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions. *Pesqui. Vet. Bras.* **2018**, *38*, 71–76. [\[CrossRef\]](#)

37. Moraes, J.O.; Cruz, E.A.; Souza, E.G.F.; Oliveira, T.C.M.; Alvarenga, V.O.; Peña, W.E.L.; Sant'Ana, A.S.; Magnani, M. Predicting adhesion and biofilm formation boundaries on stainless steel surfaces by five *Salmonella enterica* strains belonging to different serovars as a function of pH, temperature and NaCl concentration. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, *281*, 90–100. [[CrossRef](#)]
38. Berthold-Pluta, A.; Garbowska, M.; Stefańska, I.; Pluta, A. Microbiological quality of selected ready-to-eat leaf vegetables, sprouts and non-pasteurized fresh fruit-vegetable juices including the presence of *Cronobacter* spp. *Food Microbiol.* **2017**, *65*, 221–230. [[CrossRef](#)]
39. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 1870–1874. [[CrossRef](#)]
40. Mashana, S.E.; Gerwing, L.; Minde, M.; Hain, T.; Domann, E.; Lyamuya, E.; Chakraborty, T.; Imirzalioglu, C. Outbreak of a novel *Enterobacter* sp. Carrying blaCTX-M-15 in neonatal unit of a tertiary care hospital in Tanzania. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2011**, *38*, 265–269. [[CrossRef](#)]
41. Rigourd, V.; Barnier, J.P.; Ferroni, A.; Niclux, M.; Hachem, T.; Magny, J.F.; Lappillonne, A.; Frange, P.; Nassif, X.; Bille, E. Recent actuality about *Bacillus cereus* and human milk bank: A new sensitive method for microbiological analysis of pasteurized milk. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2018**, *37*, 1297–1303. [[CrossRef](#)]
42. Fakruddin, M.; Rahaman, M.; Ahmed, M.M.; Hoque, M.M. Stress tolerant virulent strains of *Cronobacter sakazakii* from food. *Biol. Res.* **2014**, *47*, 63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Morgan, J.N.; Lin, F.J.; Eitenmiller, R.R.; Barnhart, H.M.; Toledo, R.T. Thermal destruction of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in human milk. *J. Food Prot.* **1988**, *51*, 132–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Buzoleva, L.S.; Golozubova, Y.S.; Eskova, A.I.; Kim, A.V.; Bogatyrenko, E.A. Biofilm formation as a method of survival of *Escherichia coli* and *Pantoea* spp in the marine environment. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2018**, *107*, 012053. [[CrossRef](#)]
45. Korres, A.M.N.; Aquije, G.M.D.F.V.; Buss, D.S.; Ventura, J.A.; Fernandes, P.M.B.; Fernandes, A.A.R. Comparison of biofilm and attachment mechanisms of a phytopathological and clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*. *Sci. World J.* **2013**, *10*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Hošťacká, A.; Čižnár, I.; Štefkovičová, M. Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. *Folia. Microbiol.* **2010**, *55*, 75–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Nyenje, M.E.; Green, E.; Ndip, R.N. Evaluation of the effect of different growth media and temperature on the suitability of biofilm formation by *Enterobacter cloacae* strains isolated from food samples in South Africa. *Molecules* **2013**, *18*, 9582–9593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Iversen, C.; Lane, M.; Forsythe, S.J. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Lett. App. Microbiol.* **2004**, *38*, 378–382. [[CrossRef](#)]
49. Liu, S.; Chen, L.; Wang, L.; Zhou, B.; Ye, D.; Zheng, X.; Lin, Y.; Zheng, W.; Zhou, T.; Ye, J. Cluster Differences in Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, Mobility, and Virulence of Clinical *Enterobacter cloacae* Complex. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 814–831. [[CrossRef](#)]
50. Kwon, M.; Hussain, M.S.; Oh, D.H. Biofilm formation of *Bacillus cereus* under food-processing-related conditions. *Food Sci. Biotechnol.* **2017**, *26*, 1103–1111. [[CrossRef](#)]
51. Hayrapetyan, H.; Muller, L.; Tempelaars, M.; Abee, T.; Groot, M.N. Comparative analysis of biofilm formation by *Bacillus cereus* reference strains and undomesticated food isolates and the effect of free iron. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *200*, 72–79. [[CrossRef](#)]
52. Ye, Y.; Ling, N.; Jiao, R.; Wu, Q.; Han, Y.; Gao, J. Effects of culture conditions on the biofilm formation of *Cronobacter sakazakii* strains and distribution of genes involved in biofilm formation. *LWT-Food Sci. Technol.* **2015**, *62*, 1–6. [[CrossRef](#)]

Warszawa, 23.05.2025

Mateusz Gemba
mateusz_gemba@wp.pl

**Rada Dyscypliny Technologii
Żywności i Żywnienia
Szkół Główniej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Mateusz Gemba, Elżbieta Rosiak, Zuzanna Nowak-Życzyńska, Paulina Kałęcka, Elżbieta Łodykowska, Danuta Kołożyn-Krajewska (2022). *Factors Influencing Biofilm Formation by Salmonella enterica sv. Typhimurium, E. cloacae, E. hormaechei, Pantoea spp., and Bacillus spp. isolated from human milk determined by PCA analysis*. Foods, 11, 23, 3862, 1 – 14. <https://doi.org/10.3390/foods11233862> mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przeprowadzeniu doświadczenia, wykonaniu analiz, opisanu wyników, wizualizacji i napisaniu oryginalnego draftu artykułu.

Podpis

Mateusz Gemba

Warszawa, 23.05.2025

Elżbieta Rosiak
elzbieta_rosiak@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologii
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Mateusz Gemba, Elżbieta Rosiak, Zuzanna Nowak-Życzyńska, Paulina Kałęcka, Elżbieta Łodykowska, Danuta Kołożyn-Krajewska (2022). *Factors Influencing Biofilm Formation by Salmonella enterica sv. Typhimurium, E. cloacae, E. hormaechei, Pantoea spp., and Bacillus spp. isolated from human milk determined by PCA analysis*. Foods, 11, 23, 3862, 1 – 14. <https://doi.org/10.3390/foods11233862> mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji badania, przeprowadzeniu analiz, opracowaniu statystycznym wyników, edycji i korekcie merytorycznej artykułu, korespondencją z wydawcą.



Podpis

Warszawa, 06.06.2025

Zuzanna Nowak-Życzyńska
Zuzanna.Nowak-Zyczynska@abm.gov.pl

**Rada Dyscypliny Technologii
Żywności i Żywienia**

**Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Mateusz Gemba, Elżbieta Rosiak, Zuzanna Nowak-Życzyńska, Paulina Kałęcka, Elżbieta Łodykowska, Danuta Kołożyn-Krajewska (2022). *Factors Influencing Biofilm Formation by Salmonella enterica sv. Typhimurium, E. cloacae, E. hormaechei, Pantoea spp., and Bacillus spp. isolated from human milk determined by PCA analysis*. Foods, 11, 23, 3862, 1 – 14. <https://doi.org/10.3390/foods11233862> mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metodyki identyfikacji rodzaju i gatunku izolatów.

Podpis
Zuzanna
Nowak-
Życzyńska
ka

Elektronicznie
podpisany przez
Zuzanna
Nowak-
Życzyńska
Data: 2025.06.06
11:07:42 +02'00'

Warszawa, 23.05.2025

Paulina Kałęcka
paulina.kalecka13@gmail.com

**Rada Dyscypliny Technologii
Żywności i Żywienia
Szkoly Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Mateusz Gemba, Elżbieta Rosiak, Zuzanna Nowak-Życzyńska, Paulina Kałęcka, Elżbieta Łodykowska, Danuta Kołożyn-Krajewska (2022). *Factors Influencing Biofilm Formation by Salmonella enterica sv. Typhimurium, E. cloacae, E. hormaechei, Pantoea spp., and Bacillus spp. isolated from human milk determined by PCA analysis. Foods*, 11, 23, 3862, 1 – 14. <https://doi.org/10.3390/foods11233862> mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu doświadczenia, co stanowiło 2% udziału.

Podpis

Kałęcka

Elżbieta Łodykowska
ela.lodykowska@gmail.com

Warszawa, 23.05.2025

**Rada Dyscypliny Technologii
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Mateusz Gemba, Elżbieta Rosiak, Zuzanna Nowak-Życzyńska, Paulina Kałęcka, Elżbieta Łodykowska, Danuta Kołożyn-Krajewska (2022). *Factors Influencing Biofilm Formation by Salmonella enterica sv. Typhimurium, E. cloacae, E. hormaechei, Pantoea spp., and Bacillus spp. isolated from human milk determined by PCA analysis*. Foods, 11, 23, 3862, 1 – 14. <https://doi.org/10.3390/foods11233862> mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na organizacji i udostępnianiu materiału badawczego.

Elżbieta Łodykowska

Warszawa, 23.05.2025

Danuta Kołożyn-Krajewska
danuta_kolozyn_krajewska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologii
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Mateusz Gemba, Elżbieta Rosiak, Zuzanna Nowak-Życzyńska, Paulina Kałęcka, Elżbieta Łodykowska, Danuta Kołożyn-Krajewska (2022). *Factors Influencing Biofilm Formation by Salmonella enterica sv. Typhimurium, E. cloacae, E. hormaechei, Pantoea spp., and Bacillus spp. isolated from human milk determined by PCA analysis*. Foods, 11, 23, 3862, 1 – 14. <https://doi.org/10.3390/foods11233862> mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na edycji i korekcie merytorycznej artykułu.

Podpis





Development of predictive models of biofilm formation by *C. sakazakii*, *E. cloacae* on surfaces used in the food industry and medicine

Mateusz Gemba, Elżbieta Rosiak^{*}, Danuta Kołożyn-Krajewska

Institute of Human Nutrition, Department of Food Hygiene and Quality Management, Warsaw University of Life Sciences—SGGW, 02-786 Warsaw, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Predictive Microbiology
Biofilm
Medical polyvinyl chloride
Polypropylene
Stainless steel
Hygiene

ABSTRACT

Cronobacter sakazakii and *Enterobacter cloacae* exhibit the ability to form biofilms, making them resistant to drying, antibiotics, and changes in pH. These biofilms can adhere to different surfaces, including tissues, catheters, enteral feeding tubes, and work surfaces, potentially leading to cross-infection risks in both the food and medical sectors. The objective of this study was to develop a predictive model of biofilm formation over time by *C. sakazakii* and *E. cloacae* on medical polyvinyl chloride (PVC) at 37 °C and stainless steel (SS), polypropylene (PP) surfaces at 4 °C and different microbial inoculum concentration. A staining method and spectrophotometric measurement were used to assess biofilm formation. SyStat Software Inc. for Windows Table curve 3D v.4.0.05 and non-linear functions were used to develop predictive models. Analysis of biofilm formation on SS and PP surfaces at 4 °C by all analyzed bacteria suggests that hygiene procedures in refrigeration equipment should be performed daily, the maximum safe storage time for bottled milk is 24 h. At 37 °C *E. cloacae* posed the highest risk of biofilm formation on the surface of PVC tubing at 6–36 h. The six best response surface models of biofilm formation were selected for presentation. The majority of these models demonstrated good accuracy, as evidenced low mean standard errors (MSE), high coefficient R^2 and Adjusted R (Aung and Chang, 2014²). These models can be utilized to evaluate the microbiological risks in settings such as human milk banks, neonatal intensive care units and food industry plants.

1. Introduction

A biofilm is a complex structure composed of microorganisms that produce organic and inorganic substances, including exopolysaccharides. Microorganisms in this structure remain resistant to bactericides and bacteriostatic agents (Jamal et al., 2018; Sedarat and Taylor-Robinson, 2019). Currently, a biofilm is defined as a complex, three-dimensional microbial community that attaches to both living and non-living surfaces and is encapsulated within a self-generated matrix of extracellular polymeric substances (EPS). This biological matrix consists of various components such as water, microbial cells, EPS consisting of polysaccharide substances, lipids, proteins, metal ions, nucleic acids and extracellular enzymes (Hrynshyn et al., 2022; Tango et al., 2018; Verderosa et al., 2019; Percival, 2017; Guerra et al., 2022). A biofilm, by adhering to various surfaces, e.g. tissues, catheters, enteral feeding tubes, and work surfaces, poses a risk of cross-contamination in the food industry and medicine (Di Domenico et al., 2022; Lee et al., 2022; Hrynshyn et al., 2022; Sedarat and Taylor-Robinson, 2019). The presence of biofilms contributes to a higher occurrence of catheter-

related infections. Biofilms are estimated to be associated with approximately 80 % of all human infections; the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) identified that over 65 % of all hospital-acquired infections can be attributed to biofilms (Percival, 2017).

Microorganisms capable of forming biofilms exhibit resistance to drying, heating, the presence of antibiotics, and changes in pH. The formation of a bacterial biofilm is a multi-stage process that is influenced by environmental factors, the microbial species involved, and the specificity of the colonized materials (Gupta et al., 2018; Hayrapetyan et al., 2016; Vuotto et al., 2017).

The transition of bacterial cells from the planktonic phase to the three-dimensional structure of the biofilm is a dynamic process, which depends on environmental and biochemical factors. Understanding the impact of different environmental factors on biofilm development is valuable. Detailed knowledge about the dynamics of biofilm formation allows for the creation of a mathematical predictive model. This model elucidates how microorganisms respond to specific environmental conditions and can be utilized for predicting the growth, survival, and inactivation of these microorganisms. Mathematical models are

^{*} Corresponding author.

E-mail address: elzbieta_rosiak@sggw.edu.pl (E. Rosiak).

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111131>

Received 25 October 2023; Received in revised form 31 January 2025; Accepted 22 February 2025

Available online 24 February 2025

0168-1605/© 2025 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

valuable tools in mitigating microbiological safety risks, as they aid in predicting outcomes in microbiology. By utilizing these models, the labor and time required for conducting laboratory tests can be reduced. Only a few mathematical studies have been conducted to develop predictive models for biofilm formation in the scientific literature (Dimakopoulou-Papazoglou et al., 2016; Tango et al., 2018; Hu et al., 2022).

Cases of bacterial infections of the *Cronobacter* genus (Haston et al., 2023; Lachowska et al., 2021; Zeng et al., 2018; Sundararajan et al., 2018; McMullan et al., 2018; Jackson et al., 2015; Chaves et al., 2018; Bowen et al., 2017; Akineden et al., 2017), and one case of *Enterobacter cloacae* (Weems et al., 2015) have been described in the scientific literature among newborns. The source of infection was microbiological contamination of human milk obtained from donors, work surfaces, (e. g., breast pumps), and powdered infant formula (PIF). *E. cloacae* has been isolated from breast milk in studies conducted by Weems et al. (2015), Gad et al. (2021), and Gemba et al. (2022). *C. sakazakii* bacteria have been found in human milk as well as on surfaces that come into contact with milk, such as sinks, baby bottles, and breast pumps. The presence of *C. sakazakii* poses a significant risk of severe neonatal infections and complications in low birth weight (below 2 500 g) and premature infants (FAO/WHO, 2004). These infections can occur when infants consume contaminated breast milk or milk substitute, with bacteria entering the milk due to improper handling practices such as inadequate washing and disinfection of bottles and breast pumps (Haston et al., 2023; Lachowska et al., 2021; Zeng et al., 2018; Sundararajan et al., 2018; McMullan et al., 2018; Jackson et al., 2015; Chaves et al., 2018; Bowen et al., 2017). In our research, we observed that *E. cloacae* bacteria isolated from human milk demonstrated the ability to produce biofilms (Gemba et al., 2022). Therefore, we chose *E. cloacae*, isolated by our team from breast milk, for further study. *C. sakazakii* from the ATCC collection we choose as an example of cross-contamination from PIF or resulting from lack of hygiene. Given the genuine concern regarding the potential contamination of breast milk by *C. sakazakii*, *E. cloacae* as well as the risk of biofilm development on surfaces in contact with milk, there is a pressing need to evaluate the likelihood of biofilm formation on work surfaces in institutions that provide feeding care for premature and newborn infants.

Risk assessment components include exposure assessment and risk characterization, which uses mathematical predictive models. The study aimed to develop a predictive model of biofilm formation by bacteria on three surfaces, depending on the temperature and number of microorganisms. The surfaces selected for testing are surfaces that come into contact with food and human milk. For instance, enteral feeding tubes, catheter are typically composed of polyvinyl chloride (PVC). Stainless steel (SS), on the other hand, represents a low-adhesive surface that is widely utilized in the food production industry, while polypropylene (PP) is commonly employed in the manufacturing of bottles for storing and feeding infants.

2. Materials and methods

2.1. Pathogenic and opportunistic bacteria

The research materials in this study consisted of two bacterial strains (*C. sakazakii* ATCC 29544, *E. cloacae*) obtained from the ATCC collection and the collection of the Department of Hygiene and Food Quality Management, Institute of Human Nutrition Sciences, Warsaw University of Life Sciences (SGGW).

2.2. Surface testing and preparation

To evaluate biofilm production, three different surfaces were utilized: medical-grade PVC from Sumi (Poland) (Supplementary material 1), stainless steel (SS) AISI 304 (RX Poland) and PP (NUK, MedicPro). Enteral feeding catheter/tubes and bottles were purchased as a finished,

sterile medical product. Stainless steel was laser cut into 10 × 10 mm pieces and autoclave sterilized (121 °C, 15 min). The feeding tubes were sterile cut by sterile scalpel into 5 × 6.5 mm pieces. Unused, sterile milk storage bottles made of PP were sterile cut by sterile scissors into 10 × 10 mm pieces.

Depending on the material, different incubation times were used (Table 1). The PVC surface was tested at 37 °C (body core temperature), while stainless steel and polypropylene surfaces were tested at 4 °C (refrigerated storage temperature of milk).

2.3. Inoculum size and experimental conditions

To prepare the bacterial cultures, overnight isolates were placed in brain heart infusion (BHI) broth (10 ml) (Neogen, Poland) and then incubated 18–20 h at 37 °C. The desired inoculum concentration in the cultures was achieved by 10 fold diluting the overnight culture to achieve three different final cell densities. This resulted in bacterial cell densities: Low (10³ CFU/ml - L), Medium (10⁵ CFU/ml - M), and High (10⁷ CFU/ml - H). The density of the inoculum was confirmed through surface plating.

In total 66 experiment conditions were investigated for each bacterium. In the case of PVC surface there were 24 conditions (3 inoculum with 8 points) of the experiment while in the case of SS and PP there were 21 (3 inoculum with 7 time points) (Table 1).

2.4. Biofilm formation

To assess biofilm formation capacity bacterial strains were cultured in BHI broth as described above for culture preparation. The negative control sample wells contained BHI broth only. The wells of aseptically 24-well polystyrene plates (Nest Biotechnology Co. China) were filled with 200 µl of bacterial suspension. Then pieces of the tested materials (PVC, SS, PP) were aseptically transferred to the plate. The plates were covered and incubated according to the experimental design (Table 1). After incubation, inoculum volume was removed, the material pieces were rinsed six times with water, placed in a new plate, and air-dried for 45 min. After drying, the plates were stained with 200 µl of 1.0 % crystal violet (Analab, Poland) for 30 min. The crystal violet was then removed, and the material was rinsed six times with running tap water and air-dried for 45 min. 200 µl of 96 % ethanol (Poch, Poland) was used to dissolve the crystal violet bound to the biofilm for 10 min. Next, a volume of 150 µl was extracted and transferred into a fresh sterile 96-well polystyrene plate, followed by the measurement of absorbance at wavelength 600 nm utilizing a microplate reader (SoftMax Pro, USA). Absorbance (ABS) also called optical density (OD) is a measure of the absorption of radiation and is expressed by the formula:

$$ABS = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

where,

I_0 -is intensity of incident light,

I -the intensity of the light after it has passed through the absorbing medium.

The cutoff optical density (ODc) for the plate assay was determined as three times the standard deviation above the average OD-value of the

Table 1
Incubation time of the bacteria isolates [h].

Surfaces	Temperature [°C]	
	4	37
Medical polyvinyl chloride	–	3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36
Stainless steel	3, 12, 24, 36, 48, 60, 72	–
Polypropylene	3, 12, 24, 36, 48, 60, 72	–

– analyses were not performed

well with negative control. Using this criterion, the examined strains were classified into different categories in strength of biofilm formation, as follows: non-adherent (–), $OD_{600} < OD_c$; Weak (+) $OD_c < OD_{600} < 2 \times OD_c$; Moderate (++) $2 \times OD_c < OD_{600} < 4 \times OD_c$; and Strong (+++) $4 \times OD_c < OD_{600}$. The test was repeated in triplicate, in two separate experiments for each strain, and the results were averaged.

2.5. Development of a mathematical model predicting biofilm formation

The microorganisms forming a biofilm on the surface of the tested material samples change the intensity of light passing through the medium containing the dissolved biofilm. The absorbance value corresponding to the amount of biofilm produced by the bacteria is dependent on the length of time the material remains in contact with the microorganisms and the number of bacteria in the suspension (inoculum). The variables included in the mathematic models were absorbance sample values OD_{600} as the dependent variable (z) and the time (x), inoculum density (y) - as the independent variables. Calculations were performed in TableCurve 3D, v.4.0.05 for Windows, SYSTAT Software Inc. using non-linear software-specific functions from the Gaussian family, Extreme Value and Log-Normal (Table 2). The parameters of the response surface model were estimated by iterative procedures using the Levenberg-Marquardt algorithm and the precision parameter. The software assumed a maximum number of 100 iterations of the parameter estimation algorithm was chosen and the default convergence precision equal 6. This means that the parameter estimation algorithm performed max. 100 corrections of the estimated parameter value to minimize a goodness of fit merit function while the coefficient of determination will be estimated if for 5 consecutive iterations its value does not change on the 6th decimal place. For each set of variables describing the phenomenon of biofilm formation: time, inoculum density, multiple mathematical functions were tested. From the set of functions available in the program, the best one was selected for presentation in the publication. The selected function is a compromise between confidence in the model and its statistical validity. The function parameter evaluations and the quality of the statistical parameters (SE, MSE, R^2 , $DFAdj R^2$) were also considered as criteria for model evaluation. The standard error of fits (SE) is used to estimate the variability in the mean response value for a specified set of predictor values. The predictive ability of the model was assessed using, among other things, the F-value statistic and the mean squared error (MSE) score, which determines the minimum value of the sum of squared errors between empirical and fitted values divided by the degrees of freedom. The coefficient of determination R^2 and the Adjusted coefficient of determination $AdjR^2$, taking into account the number of degrees of freedom, were employed to elucidate the extent of

variability in the analyzed variables. Models which explain 75 % or more of the variation in the dependent variables were considered very good. Models whose coefficients of determination were 65–75 % were considered good, but with limited confidence in their application value, while models explaining <65 % of the variation in the dependent variables were not considered. The value of the Adjusted coefficient of determination, tests the combined effectiveness of the independent variables in explaining the variation in the dependent variable. $Adj R^2$ takes values equal to or less than the coefficient of determination and was chosen to assess the ‘propensity’ of the model to overestimate the dependent variable. Additionally, a graphical 3D analysis was conducted, comparing the observed and predicted OD values, to evaluate the performance of the developed models.

3. Results

3.1. The strength of the bacterial biofilm formed

Each experimental setup took into account: time, temperature, and inoculum density. Biofilm formation intensity was assessed using the OD_c value.

On the surface of PVC, biofilm formation by *C. sakazakii* at the tested temperature (37 °C) for 3–9 h, in each variant of the inoculum density was not detected (Table 3). Moderate biofilm formation was observed after 12 h and weak after 24 h. The *E. cloacae* strain produced a weak biofilm in 6 h of incubation (density M and H) and a moderate biofilm in from 9 to 24 h of incubation (density M and H). In the case of S density inoculum, a moderate biofilm was formed after 18 h. However, at the 36-h mark, biofilm production was observed in case *E. cloacae* (with a weak biofilm at H density and a moderate biofilm at M density) (Table 3).

A biofilm was observed on the SS surface at 4 °C after 36 and 48 h of incubation (Table 4). During 36 h of incubation, *C. sakazakii* produced a weak biofilm (inoculum density H), *E. cloacae* produced a weak biofilm (density L), moderate (density M), and strong biofilm (density H). In 48 h of incubation, both tested bacteria produced a strong biofilm, except for *E. cloacae* – moderate biofilm (density M). At 60 h incubation, a moderate biofilm produced only *C. sakazakii* (density H) (Table 4).

On the surface of PP (Table 5), at 4 °C, biofilm was formed comparable to the surface of stainless steel. The formation of bacterial structures was observed at 36 and 48 h of incubation. At 36 h of incubation, *E. cloacae* produced a moderate biofilm, and *C. sakazakii* produced a weak (density L and M) and moderate (density H) biofilm. After 48 h of incubation, a strong biofilm was observed in each variant of the inoculum density, in the case of *C. sakazakii* while *E. cloacae* produced a

Table 2
Used non-linear function.

No	Function name in TableCurve 3D	Function equation
1	Extreme Value Single Width Function	$z = a \exp \left[-\exp \left(-\frac{x-b}{c} \right) - \frac{x-b}{c} + 1 \right] * \exp \left[-\exp \left(-\frac{y-d}{e} \right) - \frac{y-d}{e} + 1 \right]$
2	Extreme Value Single Width w/Intercept Function	$z = a + b \exp \left[-\exp \left(-\frac{x-c}{d} \right) - \frac{x-c}{d} + 1 \right] * \exp \left[-\exp \left(-\frac{y-d}{e} \right) - \frac{y-d}{e} + 1 \right]$
3	Gaussian Additive Function	$z = a \exp \left[-0.5 \left(\frac{x-b}{c} \right)^2 \right] + d \exp \left[-0.5 \left(\frac{y-e}{f} \right)^2 \right]$
4	Log Normal w/Intercept Function	$z = a + b \exp \left\{ -0.5 \left[\left(\frac{\ln \left(\frac{x}{c} \right)}{d} \right)^2 + \left(\frac{\ln \left(\frac{y}{e} \right)}{f} \right)^2 \right] \right\}$
5	Log Normal Single Width Function	$z = a \exp \left\{ -0.5 \left[\left(\frac{\ln \left(\frac{x}{c} \right)}{d} \right)^2 + \left(\frac{\ln \left(\frac{y}{e} \right)}{f} \right)^2 \right] \right\}$

z-prediction biofilm formation [dimensionless value], x -time [h], y – inoculum density [log cfu/ml], a, b, c, d, e, f – parameters to be estimated.

Table 3

Biofilm strength on PVC surface in different combinations of inoculum size and time at a constant temperature (37 °C).

Kind of bacteria	Inoculum size	Time of incubation [h]							
		3	6	9	12	18	24	30	36
<i>C. sakazakii</i> ATCC 29544	L	–	–	–	++	–	+	–	–
	M	–	–	–	–	–	–	–	–
	H	–	–	–	++	–	+	–	–
<i>E. cloacae</i>	L	–	–	–	+	++	++	–	–
	M	–	+	++	++	++	++	–	++
	H	–	+	++	++	++	++	–	+

(–) non-adherent; Weak biofilm (+); Moderate biofilm (++); Strong biofilm (+++).

L- Low, 10³ CFU/ml, M- Medium, 10⁵ CFU/ml, H- High, 10⁷ CFU/ml.**Table 4**

Biofilm strength on SS surface in different combinations of inoculum size and time at a constant temperature (4 °C).

Kind of bacteria	Inoculum size	Time of incubation [h]							
		3	12	24	36	48	60	72	
<i>C. sakazakii</i> ATCC 29544	L	–	–	–	–	+++	–	–	
	M	–	–	–	–	+++	–	–	
	H	–	–	–	+	+++	++	–	
<i>E. cloacae</i>	L	–	–	–	+	+++	–	–	
	M	–	–	–	++	++	–	–	
	H	–	–	–	+++	+++	–	–	

(–) non-adherent; Weak biofilm (+); Moderate biofilm (++); Strong biofilm (+++)

L- Low, 10³ CFU/ml, M- Medium, 10⁵ CFU/ml, H- High, 10⁷ CFU/ml.**Table 5**

Biofilm strength on PP surface in different combinations of inoculum size and time at a constant temperature (4 °C).

Kind of bacteria	Inoculum size	Time of incubation [h]							
		3	12	24	36	48	60	72	
<i>C. sakazakii</i> ATCC 29544	L	–	–	–	+	+++	–	–	
	M	–	–	–	+	+++	–	–	
	H	–	–	–	++	+++	–	–	
<i>E. cloacae</i>	L	–	–	–	++	+	–	–	
	M	–	–	–	++	++	–	–	
	H	–	–	–	++	++	–	–	

(–) non-adherent; Weak biofilm (+); Moderate biofilm (++); Strong biofilm (+++)

L- Low, 10³ CFU/ml, M- Medium, 10⁵ CFU/ml, H- High, 10⁷ CFU/ml.

moderate (M and H density) and a weak (L density) biofilm (Table 5). In the tests carried out on the PVC surface, a discontinuity of biofilm formation was observed. In the case of *E. cloacae* (M and H inoculum densities) biofilm formation was observed at 6–24 h, was not observed after 30 h, but was re-identified after 36 h (M and H inoculum). A similar phenomenon was observed on the same surface for *C. sakazakii* ATCC 29544. Biofilm formation was observed after 12 h and 24 h, but was not observed after 18 h on the tested surface (Table 3). This finding may be explained by the cyclical nature of biofilm formation. In the last stadium of biofilm formation, the biofilm reaches maturity and can detach from the surface and disperse. Dispersion refers to the dispersal of microorganisms, which begin to re-organize into a stable structure (Rather et al., 2021). Biofilm dispersion means the recurrent contamination of the environment and an uncontrolled increase in microbial risk.

3.2. Mathematical models predicting biofilm formation

The response surface models for the two independent variables (time and inoculum concentration) were developed based on the experimental data. Table 6 provides the estimated parameters for the developed models, which range from 4 to 6 parameters. For the models selected for

presentation, the number of iterations did not exceed 50 because the algorithm had converged to the “true” parameters. Parameters estimation was initialized most often by entering a value of 1.0 for the initial estimation or a value that was saved when using a defined User-Defined Function (UDF). Sometimes the tool Adjust was used and a parameter was estimated by graphically adjust.

Half ($n = 3$) of the developed models have 4 parameters (a-d). In the models comprising four and five parameters, most parameters estimates were found to be statistically significant ($p < 0.05$). This significance is further supported by the high values of the F statistic, respectively 59.4–32.2; 14.8; 9.41–7.23 in 4, 5 and 6 parameters in the model. If F is significant, it means that the model describes the data better than the mean value. A higher value of the F-statistic in case of models with fewer parameters shows that better represent the data parametrically. Additionally, the independent variables of inoculum density and time were found to have a significant impact on the dependent variable of biofilm formation. However, in models with six parameters, parameters e and f (in two cases) did not significantly ($p < 0.05$) influence the phenomenon of biofilm formation. Noteworthy are the low asymptotic mean errors of parameter estimation (standard error), which allow us to assume that the parameters have been estimated precisely enough to be trusted. SE were used to generate confidence intervals for the predictions. The MSE was used for the characteristics and comparisons of the developed models. The coefficient of determination (R^2) is used as a general measure of the fit of the estimated model to the empirical data as well as the independent variables' explanation of the variability of the dependent variable. In reality, when estimating the parameters of a significantly non-linear function due to parameters, parameter estimation involves estimating the parameters of an approximation of this function with a tangent at the point of true parameter values and locally in close proximity to the point of tangency. Therefore, we can transfer the quality measures of the linear model to an almost identical original model, since locally the model and the linear approximation are almost identical. TableCurve 3D's non-linear fitting engine is a 64-bit Levenburg-Marquardt algorithm that uses the Gauss-Jordan procedure for the matrix inverse required in each iteration. In non-linear fitting, the parameters are iteratively adjusted to minimize a goodness of fit. If the algorithm is fully successful, a true global minimum (the true least-squares fit) is achieved. A precision of convergence of 6 was assumed. This means that the R^2 coefficient of determination must be unchanging in the sixth decimal place for five consecutive iterations to signal convergence.

The horizontal plane in Figs. 1–6B means that the data lies exactly on the regression plane ($R^2 = 1$) and the variability is 100 % explained; when $R^2 = 0$, there is no correlation between the variables in the model, and the regression does not explain anything. In the case when the regression coefficient takes the value $0 < R^2 < 1$, there is a relationship between the variables.

The similar value of the coefficient of determination as a parameter proving the quality of fit, in the case of medical PVC surfaces, was obtained for the *C. sakazakii* and *E. cloacae* models with R^2 values of 0.756 and 0.723, respectively (Figs. 1 and 2). Low values of SE and MSE errors

Table 6
Characteristics of the developed models of biofilm formation by *C. sakazakii* and *E. cloacae* on the surfaces of PVC, SS and PP.

Kind of bacteria	No of function	Model Indicator	Model parameters			Model quality parameters							
			a	b	c	d	e	f	R ²	Adj R ²	SE	F-val	MSE
Surfaces: PVC <i>C. sakazakii</i>	2	Parameter value	0.092	0.350	12.02	1.60	7.47	–	0.756	0.688	0.043	14.8	0.001
		SE	0.0097	0.092	1.47	0.669	1.20	–	–	–	–	–	–
		t-value	9.54	3.80	8.18	2.39	6.24	–	–	–	–	–	–
		p-value	0.000	0.00122	0.000	0.0273	0.000	–	–	–	–	–	–
<i>E. cloacae</i>	3	con. Limit	0.072–0.112	0.157–0.543	8.95–15.10	0.2–3.00	4.97–9.98	–	–	–	–	–	–
		Parameter value	0.375	18.7	6.68	0.161	2.5	0.789	0.723	0.625	0.093	9.41	0.006
		SE	0.062	0.887	1.58	0.053	0.218	0.514	–	–	–	–	–
		t-value	5.99	21.0	4.23	3.01	11.4	1.53	–	–	–	–	–
Surfaces: SS <i>C. sakazakii</i>	4	p-value	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.142	–	–	–	–	–
		con. Limit	0.243–0.507	16.8–20.5	3.36–10.1	0.048–0.275	2.04–2.95	0.291–1.87	–	–	–	–	–
		Parameter value	0.024	0.15	43.9	0.136	5.86	0.738	0.707	0.582	0.028	7.23	0.000
		SE	0.008	0.049	1.63	0.044	2.91	0.682	–	–	–	–	–
<i>E. cloacae</i>	1	t-value	2.89	3.02	29.9	3.1	2.02	1.08	–	–	–	–	–
		p-value	0.0113	0.00869	0.000725	0.0621	0.0621	0.297	–	–	–	–	–
		Con. limit	0.006–0.042	0.044–0.256	40.4–47.4	0.042–0.230	0.336–12.1	0.714–2.19	–	–	–	–	–
		Parameter value	1.34	34.9	6.24	13.5	–	–	0.864	0.831	0.057	36.3	0.002
<i>E. cloacae</i>	1	SE	0.535	1.65	0.778	1.85	–	–	–	–	–	–	–
		t-value	2.51	21.2	8.02	7.29	–	–	–	–	–	–	–
		p-value	0.0224	0.000	0.000	0.000	–	–	–	–	–	–	–
		Con. limit	0.214–2.47	31.4–38.4	4.6–7.88	9.59–17.4	–	–	–	–	–	–	–
Surfaces: pp <i>C. sakazakii</i>	1	Parameter value	0.398	40.61	4.87	8.18	–	–	0.912	0.891	0.024	59.4	0.000
		SE	0.127	0.317	1.44	1.73	–	–	–	–	–	–	–
		t-value	3.13	128	3.39	4.73	–	–	–	–	–	–	–
		p-value	0.00605	0.000	0.00351	0.00019	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. cloacae</i>	5	Con. limit	0.13–0.667	39.9–41.3	1.83–7.9	4.53–11.8	–	–	–	–	–	–	–
		Parameter value	0.725	37.2	0.171	6.38	–	–	0.85	0.813	0.06	32.2	0.003
		SE	0.198	2.12	0.041	0.267	–	–	–	–	–	–	–
		t-value	3.65	17.5	4.13	23.8	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. cloacae</i>	5	p-value	0.00196	0.000	0.0007	0.000	–	–	–	–	–	–	–
		Con. limit	0.306–1.14	32.7–41.7	0.083–0.258	5.81–6.94	–	–	–	–	–	–	–

SE-standard error; DF Adj R²–degree of freedom Adjusted R² SE- Standard Error of Fitt. F-val-F value. MSE-Mean Squared Error; conf limit-95 % confidence limit; “–”not applicable.

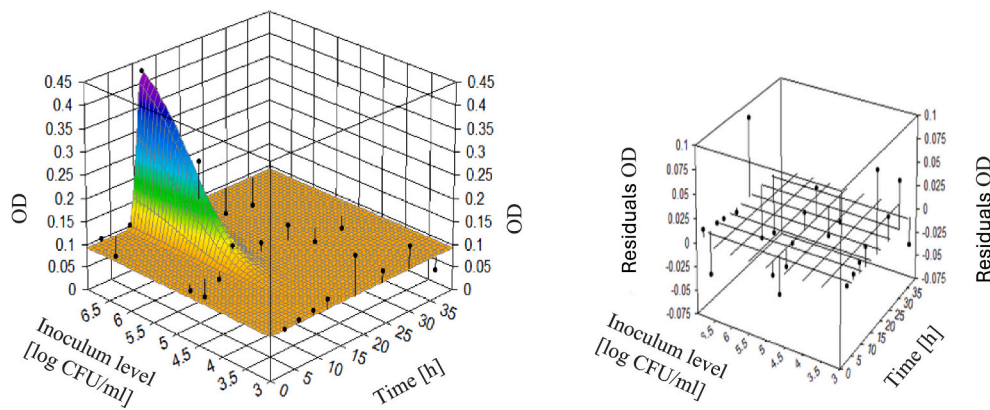


Fig. 1. A. Biofilm formation response surface model; B. Comparison between predicted and observed values OD biofilm formation by *C. sakazakii* ATCC 29544 on PVC surface.

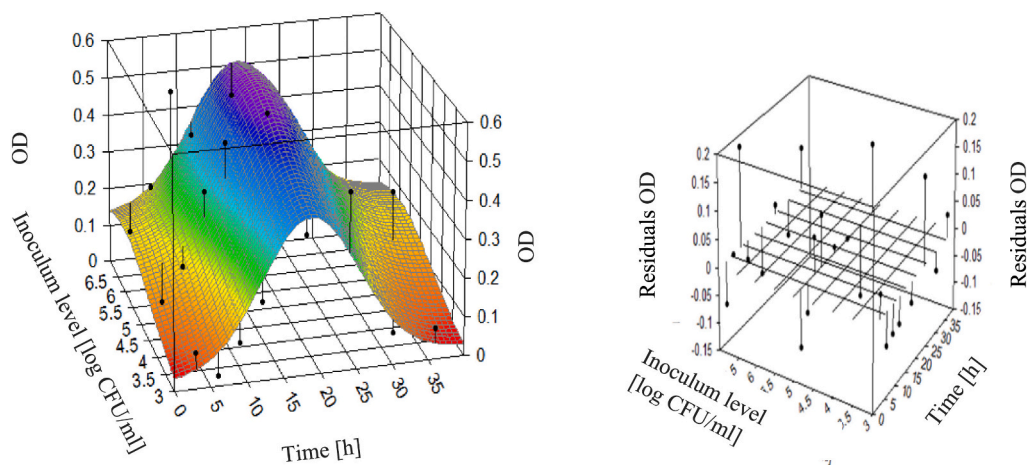


Fig. 2. A. Biofilm formation response surface model; B. Comparison between predicted and observed values OD biofilm formation by *E. cloacae* on PVC surface.

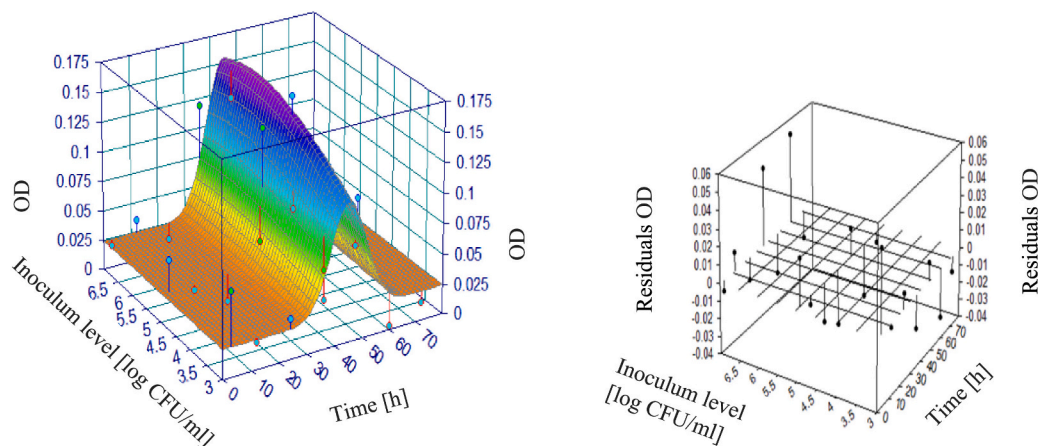


Fig. 3. A. Biofilm formation response surface model; B. Comparison between predicted and observed values OD biofilm formation by *C. sakazakii* ATCC 29544 on SS surface.

allow for a good assessment of the developed model. However, due to the value of the $DFAdjR^2$ coefficient (0.688 and 0.625) revising the combined explanation of the variability of the dependent variable by the dependent variables, limited confidence should be placed in the estimates based on the models developed for PVC surfaces. >30 % of the variation in biofilm formation is not explained by the variables included in the models. There is another factor or factors that determine biofilm

formation by the microorganisms under study.

In the case of stainless-steel surfaces, the fit of the developed models was 0.869 and 0.707 for *E. cloacae* and *C. sakazakii* respectively (Figs. 3 and 4). As with the models obtained on PVC for the *C. sakazakii*, limited confidence should be maintained also for SS surface model ($DFAdjR^2 = 0.582$). The highest value of the R^2 and $DFAdjR^2$ for the PP surface ($R^2 = 0.912$) was obtained for the model of *C. sakazakii* (Fig. 5). In the case of

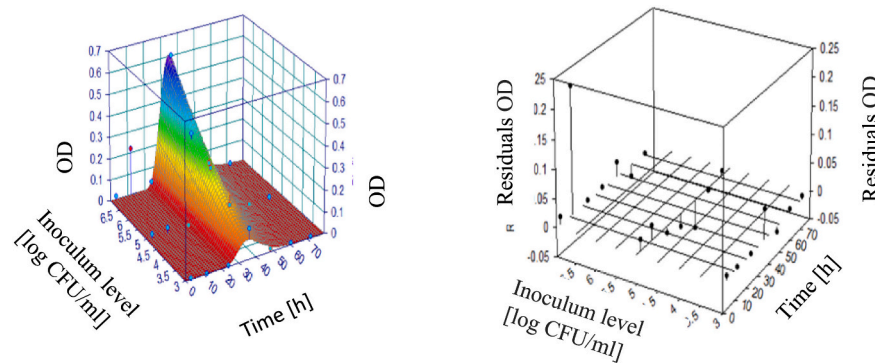


Fig. 4. A. Biofilm formation response surface model; B. Comparison between predicted and observed values OD biofilm formation by *E. cloacae* on SS surface.

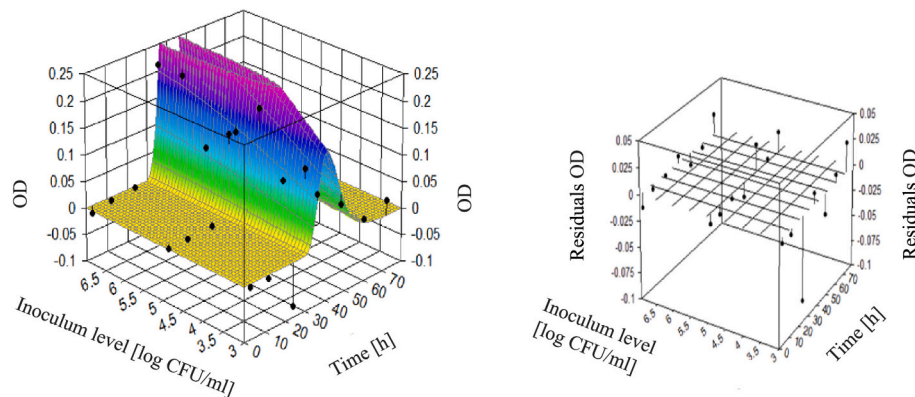


Fig. 5. A. Biofilm formation response surface model; B. Comparison between predicted and observed values OD biofilm formation by *C. sakazakii* ATCC 29544 on PP surface.

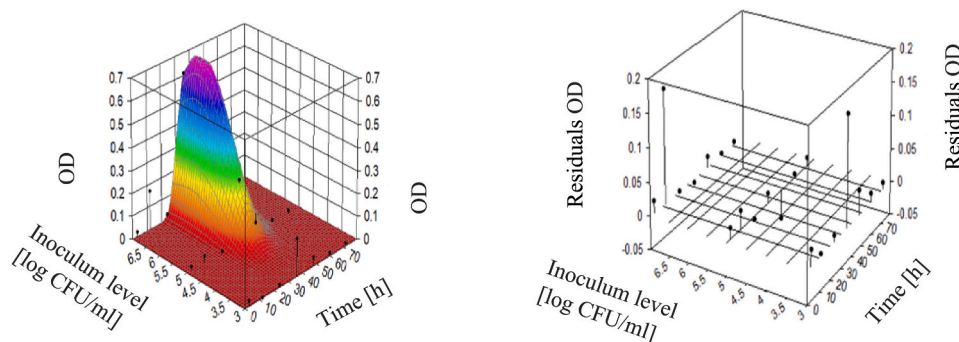


Fig. 6. A. Biofilm formation response surface model; B. Comparison between predicted and observed values OD biofilm formation by *E. cloacae* on PP surface.

the *E. cloacae*, the R^2 values was 0.850 (Figs. 6). The high DFAdj R^2 values allow high confidence in the developed models.

4. Discussion

In the conducted research, the ability to produce biofilm by bacteria on a PVC surface at a temperature of 37 °C was assessed. *E. cloacae* produced a biofilm from the 6th hour of incubation. The study by Misra et al. (2022) evaluated the biofilm production capacity of *E. cloacae*, on enteral feeding tubes at 24, 48, 72, 96, and 120 h at 37 °C. Intense biofilm production, the researchers observed, from 24 h of incubation with an increasing trend up to 96 h. In our study, the samples were incubated for up to 36 h and the formation of biofilm was observed at all times, except for the 3rd and 30th hours of incubation. In the case of *C. sakazakii*, a biofilm was observed only at 12 and 24 h of incubation.

Variations in biofilm growth and progression over time may be correlated with the transition from the maturation phase to the dispersion phase of the biofilm. Mechanism of biofilm formation is an explanation for the fact that after prolonged observation, no biofilm was found while one was previously present. The time of onset of dispersion is an important factor from the point of view of food safety in assessing the recurrent contamination of food and other surfaces and the recurrent formation of biofilm (Misra et al., 2022). Out of the bacteria tested, *E. cloacae* demonstrated the most rapid colonization of the enteral tube surfaces, achieving colonization after 6 h. *E. cloacae* is one of the most frequently isolated hospital pathogens. It causes opportunistic infections and colonizes medical equipment forming a biofilm on them (Misra et al., 2022).

The reason for selecting a temperature of 4 °C was its significance within the context of the food cold chain. Refrigeration temperatures are

critical in slowing down bacterial growth (Aung and Chang, 2014). However, despite the slowdown in growth, the bacteria can still produce a biofilm. In our study, examined bacteria strains did not exhibit any growth at refrigeration temperature. However, a biofilm was produced by all strains starting from 36 h on both tested surfaces. Determining the exact optimal temperature conditions for biofilm development is challenging due to variability among strains. Interestingly, in certain strains, decreasing the incubation temperature can inhibit bacterial growth while promoting biofilm formation. This phenomenon may constitute a significant health risk. Storing milk or milk substitute in a refrigerated bottle may facilitate the formation of a biofilm on the material's surface.

In this study, response surface models were created to illustrate the relationship between biofilm formation, time and inoculum density. Response surface models are empirical models that describe the response of microbial populations to, more than one environmental factors. Matching mathematical relationships to the course of empirical data is one of the criteria for evaluating the model (Rosiak et al., 2018). The models were developed using non-linear functions from the family of Gaussian, Extreme Value and Log Normal. Tango et al. (2018) developed a predictive model of *Staphylococcus aureus* biofilm-producing capacity depending on pH, water activity and ethanol concentration. The researchers used the cardinal values of environmental factors (minimum, optimal, and maximum) to develop the models. Cardinal parameter models were also used to develop the model by Dimakopoulou-Papazoglou et al. (2016), who developed a model of *Salmonella enterica* ser. Biofilm formation capacity Newport depending on pH and water activity. Hu et al. (2022) developed logistic regression models for the likelihood of adhesion and biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. Moraes et al. (2018) developed a model of adhesion limits and biofilm formation by *Salmonella enterica* on the surface of stainless steel, using a second-order logistic regression model.

The developed models were characterized by low SE and MSE errors. The value of SE for the developed models did not exceed 0.094, and the max. Value of MSE was 0.006. The developed models largely confirmed the influence of the independent variables included in the experiment in determining biofilm formation. Hence, response surface models can be deemed a valuable tool for evaluating the impact of different factors on the intricate process of biofilm formation. The risk of biofilm formation is strongly influenced by both inoculum density and microbial stressogenic factors. The number of bacteria (inoculum density) can play a key role as a factor in biofilm formation, directly influencing the level of food cross-contamination.

Based on the values of the coefficient of determination, the mathematical models developed in our study explain the phenomenon of biofilm formation well ($n = 2$) and very well ($n = 4$) (Table 6). The best and worst scores based on the criterion of the coefficient of determination were obtained by the models when describing biofilm formation on the surface of SS and PP by *C. sakazakii* (Figs. 3 and 5).

Considering the reported risk of breast milk contamination and the occurrence of infections in newborns caused by *C. sakazakii*, and *E. cloacae* and the ability of these bacteria to produce a biofilm (Haston et al., 2023; Lachowska et al., 2021; Akineden et al., 2017; McMullan et al., 2018; Zeng et al., 2018; Chaves et al., 2018; Bowen et al., 2017; Weems et al., 2015; Sundararajan et al., 2018; Jackson et al., 2015; Gemba et al., 2022), the models derived from this research can serve as a valuable tool for assessing the microbiological risks in human milk banks, neonatal units, and neonatal intensive care units.

5. Conclusions

The obtained predictive models were characterized by low value of SE and MSE errors and good ($n = 2$) and very good ($n = 4$) fit coefficients to the empirical data, indicating that the independent variables inoculum density and time are responsible for biofilm formation. The Extreme Value Single Width function was used more frequently than other functions to explain the phenomenon of biofilm formation on the

tested surfaces, which may indicate its potential use in the future to describe the phenomenon and the need to interpret the parameters of the function in the context of the mechanism of biofilm formation.

From the tested bacteria *E. cloacae* induced the highest risk of biofilm formation on the surface.

the surface of PVC enteral tubes at 37 °C after 6 h. However, after taking into account the Adjusted R-squared, which indicated a decrease in predictive power, the developed model cannot be considered as good. A similar situation applies to the case of biofilm formation by *C. sakazakii* on the surface of stainless steel. These models have limited applicability.

Nevertheless, the other models developed, showed satisfactory parameter estimation and demonstrated a good fit to the data and can be used to assess the risk of biofilm formation in environments such as human milk banks, neonatal care units and neonatal intensive care units and food processing plants. Examination of biofilm formation on PP surfaces at 4 °C for the bacteria analyzed suggests that the maximum safe storage time for milk is 24 h.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111131>.

CRediT authorship contribution statement

Mateusz Gemba: Writing – original draft, Investigation, Formal analysis, Writing – review & editing. **Elżbieta Rosiak:** Writing – original draft, Resources, Project administration, Methodology, Conceptualization, Data curation, Investigation, Supervision, Writing – review & editing. **Danuta Kołożyn-Krajewska:** Funding acquisition, Supervision.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

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.

Acknowledgements

To Antoni Goryl, PhD for his substantive support, inspiration and critical comments

Data availability

Data will be made available on request.

References

- Akineden, O., Heinrich, V., Grossb, M., Usleber, E., 2017. Reassessment of *Cronobacter* spp. originally isolated as *Enterobacter sakazakii* from infant food. Food Microbiol. 65, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.021>.
- Aung, M.M., Chang, Y.S., 2014. Temperature management for the quality assurance of a perishable food supply chain. Food Control 40, 198–207. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.016>.
- Bowen, A., Wiesenfeld, H.C., Kloes, J.L., Pasculle, A.W., Nowalk, A.J., Brink, L., Elliott, E., Martin, H., Tarr, C.L., 2017. Notes from the field: *Cronobacter sakazakii* infection associated with feeding extrinsically contaminated expressed human milk to a premature infant—Pennsylvania, 2016. MMWR 66, 761–762. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6628a5>.
- Chaves, C.E.V., Brandão, M.L.L., Lacerda, M.L.G.G., Rocha, C.A.B.C., Leone de Oliveira, S.M.D.V., Parpinelli, T.C., Vasconcellos, L., Forsythe, S.J., Paniago, A.M.M., 2018. Fatal *Cronobacter sakazakii* sequence type 494 meningitis in a newborn. Brazil. Emerg. Infect. Dis 24, 1948–1950. <https://doi.org/10.3201/eid2410.180373>.
- Di Domenico, E.G., Oliva, A., Guembe, M., 2022. The current knowledge on the pathogenesis of tissue and medical device-related biofilm infections. Microorganisms 10 (7), 1–16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071259>.

- Dimakopoulou-Papazoglou, D., Lianou, A., Koutsoumanis, K.P., 2016. Modelling biofilm formation of *salmonella enterica* ser. Newport as a function of pH and water activity. *Food Microbiol.* 53, 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.002>.
- FAO/WHO, 2004. *Enterobacter sakazakii* and microorganisms in powdered infant formula: Meeting Report 2004.
- Gad, S., Sheta, M.M., Al-Khalafawi, A.I., Abu El-Fadl, H.A., Anany, M., Sahmoud, S., Amin, M.K., 2021. Expressed breast milk contamination in neonatal intensive care unit. *Pediatric Health, Medicine and Therapeutics* 12, 307–313. <https://doi.org/10.2147/PHMT.S311632>.
- Gemba, M., Rosiak, E., Nowak-Życzyńska, Z., Kałęcka, P., Łodykowska, E., Kolożyn-Krajewska, D., 2022. Factors influencing biofilm formation by *salmonella enterica* sv. Typhimurium, *E. Cloacae*, *E. Hormaechei*, *Pantoea* spp., and *Bacillus* spp. isolated from human Milk determined by PCA analysis. *Foods*, 11(23), 3862. doi:<https://doi.org/10.3390/foods11233862>.
- Guerra, M.E.S., Destro, G., Vieira, B., Lima, A.S., Ferraz, L.F.C., Hakansson, A.P., Darrieux, M., Converso, T.R., 2022. *Klebsiella pneumoniae* biofilms and their role in disease pathogenesis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.877995>.
- Gupta, T.B., Mowat, E., Brightwell, G., Flint, S.H., 2018. Biofilm formation and genetic characterization of New Zealand *Cronobacter* isolates. *J. Food Saf.* 38, 1–13. <https://doi.org/10.1111/jfs.12430>.
- Haston, J.C., Miko, S., Cope, J.R., McKeel, H., Walters, C., Joseph, L.A., Griswold, T., Katz, L.S., Andújar, A., A., Tourdot, L., Rounds, J., Vagnone, P., Medus, C., Harris, J., Geist, R., Neises, D., Wigginton, A., Smith, T., Im, M. S., Wheeler, C., Smith, P., Carleton, H. A., Lee, C. C., 2023. *Cronobacter sakazakii* infections in two infants linked to powdered infant formula and breast pump equipment—United States, 2021 and 2022. *MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.* 72 (9), 223–226. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7209a2>.
- Hayrapetyan, H., Abee, T., Nierop-Groot, M., 2016. Sporulation dynamics and spore heat resistance in wet and dry biofilms of *Bacillus cereus*. *Food Control* 60, 493–499. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.08.027>.
- Hrynshyn, A., Simões, M., Borges, A., 2022. Biofilms in surgical site events: recent advances and new strategies described and combated. *Antibiotics* 11 (1), 69. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010069>.
- Hu, L., Dong, Q., Li, Z., Ma, Y., Aslam, M.Z., Liu, Y., 2022. Modelling the adhesion and biofilm formation boundary of *listeria monocytogenes* ST9. *Foods* 11 (13), 1–11. <https://doi.org/10.3390/foods11131940>.
- Jackson, E.E., Flores, J.P., Fernández-Escartín, E., Forsythe, S.J., 2015. Reevaluation of a suspected *Cronobacter sakazakii* outbreak in Mexico. *J. Food Prot.* 78, 1191–1196. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-563>.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M.A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., Kamil, M.A., 2018. Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chin. Med. Assoc.* 81 (1), 7–11.
- Lachowska, M., Izdebski, R., Urbanowicz, P., Żabicka, D., Królak-Olejnik, B., 2021. Infection of *Cronobacter sakazakii* ST1 producing SHV-12 in a premature infant born from triplet pregnancy. *Microorganisms* 9 (9), 1–6. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091878>.
- Lee, S.H.I., Portinari, M.R.P., Corassin, C.H., Oliveira, C.A.F., 2022. Biofilms from pathogenic bacteria in food processing environments: creation and preventive disinfection procedures. *Food Sci. Technol. Int.* 3 (1), 12–19. <https://doi.org/10.37256/fse.3120221122>.
- McMullan, R., Menon, V., Beukers, A.G., Jensen, S.O., van Hal, S.J., Davis, R., 2018. *Cronobacter sakazakii* infection from expressed breast milk. *Australia. Emerg. Infect. Dis.* 24, 393–394. <https://doi.org/10.3201/eid2402.171411>.
- Misra, T., Tare, M., Jha, P.N., 2022. Insights into the dynamics and composition of biofilm formed by environmental isolate of *Enterobacter cloacae*. *Front. Microbiol.* 13, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.877060>.
- Moraes, J.O., Cruz, E.A., Souza, E.G., Oliveira, T.C., Alvarenga, V.O., Peña, W.E., Sant'Ana, A.S., Magnani, M., 2018. Predicting adhesion and biofilm formation boundaries on stainless steel surfaces by five *salmonella enterica* strains belonging to different serovars as a function of pH, temperature and NaCl concentration. *Int. J. Food Microbiol.* 281, 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.011>.
- Percival, S.L., 2017. Importance of biofilm formation in surgical infection. *Br. J. Surg.* 104 (2), 85–94. <https://doi.org/10.1002/bjs.10433>.
- Rather, M.A., Gupta, K., Mandal, M., 2021. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Braz. J. Microbiol.* 52, 1701–1718. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x>.
- Rosiak, E., Kajak-Siemaszko, K., Trzaskowska, M., Kolożyn-Krajewska, D., 2018. Predictive microbiology of food. *Post. Mikrobiol.* 3, 227–241. <https://doi.org/10.21307/PM-2018.57.3.229>.
- Sedarat, Z., Taylor-Robinson, A.W., 2019. A consideration of antibacterial agent efficacies in the treatment and prevention of formation of *Staphylococcus aureus* biofilm. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 9 (4), 167–172. <https://doi.org/10.5799/jmid.657903>.
- Sundararajan, M., Enane, L.A., Kidwell, L.A., Gentry, R., Danao, S., Bhumbra, S., Lehmann, C., Teachout, M., Yeadon-Fagbohun, J., Krombach, P., Schroeder, B., Martin, H., Winkler, J., Waltz, T., Stryko, J., Cope, J.R., 2018. Notes from the field: *Cronobacter sakazakii* meningitis in a full-term neonate fed exclusively with breast milk—Indiana, 2018. *MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.* 67, 1248–1249. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6744a7>.
- Tango, C.N., Akkermans, S., Hussain, M.S., Khan, I., Van Impe, J., Jin, Y.G., Oh, D.H., 2018. Modeling the effect of pH, water activity, and ethanol concentration on biofilm formation of *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiol.* 76, 287–295. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.006>.
- Verderosa, A.D., Totsika, M., Fairfull-Smith, K.E., 2019. Bacterial biofilm eradication agents: a current review. *Front. Chem.* 7, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00824>.
- Vuotto, C., Longo, F., Pascolini, C., Donelli, G., Balice, M.P., Libori, M.F., Tiracchia, V., Salvia, A., Varaldo, P.E., 2017. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *J. Appl. Microbiol.* 123, 1003–1018. <https://doi.org/10.1111/jam.13533>.
- Weems, M.F., Dereddy, N.R., Arnold, S.R., 2015. Mother's Milk as a source of *Enterobacter cloacae* sepsis in a preterm infant. *Breastfeed. Med.* 10 (10), 1–2. <https://doi.org/10.1089/bfm.2015.0146>.
- Zeng, H., Lei, T., He, W., Zhang, J., Liang, B., Li, C., Ling, N., Wu, S., Wang, J., Wu, Q., 2018. Novel multidrug-resistant *Cronobacter sakazakii* causing meningitis in neonate, China, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* 24, 2121–2124. <https://doi.org/10.3201/eid2411.180718>.

Warszawa, 23.05.2025

Mateusz Gemba
mateusz_gemba@wp.pl

**Rada Dyscypliny Technologii
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Mateusz Gemba, Elżbieta Rosiak, Danuta Kołożyn-Krajewska (2025). *Development of predictive models of biofilm formation by C. sakazakii, E. cloacae on surfaces used in the food industry and medicine*. International Journal of Food Microbiology, 434, 111131, 1-9 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111131> mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przeprowadzeniu doświadczenia, wykonaniu analiz, opisanu wyników, wizualizacji i napisaniu oryginalnego draftu artykułu.

Podpis

Mateusz Gemba

Warszawa, 23.05.2025

Elżbieta Rosiak
elzbieta_rosiak@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologii
Żywności i Żywienia
Szkół Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Mateusz Gemba, Elżbieta Rosiak, Danuta Kołożyn-Krajewska (2025). *Development of predictive models of biofilm formation by C. sakazakii, E. cloacae on surfaces used in the food industry and medicine*. International Journal of Food Microbiology, 434, 111131, 1-9 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111131> mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji badania, przeprowadzeniu analiz, opracowaniu statystycznym wyników, edycji i korekcie merytorycznej artykułu, korespondencją z wydawcą.



Podpis

Warszawa, 23.05.2025

Danuta Kołożyn-Krajewska
Danuta_kolozyn_krajewska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologii
Żywności i Żywienia
Szkół Główniej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Mateusz Gemba, Elżbieta Rosiak, Danuta Kołożyn-Krajewska (2025). *Development of predictive models of biofilm formation by C. sakazakii, E. cloacae on surfaces used in the food industry and medicine*. International Journal of Food Microbiology, 434, 111131, 1-9 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111131> mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na edycji i korekcie merytorycznej artykułu.

Podpis

