

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
Π.Μ.Σ «ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης κυττάρων *Salmonella*  
*Typhimurium* κατά την επιβίωση και ανάπτυξη σε φυτικό  
ιστό *in vitro* και *in situ*»

Παπαϊωάννου Ε. Μαρία  
Υπότροφος Ιδρύματος Ωνάση

Επιβλέπων Καθηγητής: Νυχάς Γεώργιος – Ιωάννης

ΑΘΗΝΑ, 2014

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης κυττάρων *Salmonella*  
*Typhimurium* κατά την επιβίωση και ανάπτυξη σε φυτικό  
ιστό *in vitro* και *in situ*»

Παπαϊωάννου Ε. Μαρία

Επιβλέπων καθηγητής: Νυχάς Γεώργιος – Ιωάννης

Εξεταστική Επιτροπή: Νυχάς Γεώργιος – Ιωάννης, Καθηγητής

Πανάγου Ευστάθιος, Επίκουρος Καθηγητής

Ταμπακάκη Αναστασία, Επίκουρος Καθηγήτρια

## Ευχαριστίες

Από την παρούσα θέση θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον επιβλέποντα καθηγητή της Μεταπτυχιακής μου διατριβής κ. Νυχά Γεώργιο – Ιωάννη για την ανάθεση του θέματος της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διατριβής αλλά και για την καθοδήγηση του κατά την εκπόνηση της μελέτης.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην Δρ. Δουλγεράκη Ι. Αγάπη για την πολύτιμη βοήθεια και διαρκή καθοδήγησή της κατά την εκτέλεση του πειράματος, για τη συμβολή της κατά τη συγγραφή της παρούσας μελέτης, για την αμέριστη συμπαράσταση και στήριξη της μέχρι το τέλος της εργασίας μου και για όλα όσα μου δίδαξε με την εκπόνηση αυτής της μελέτης.

Ευχαριστώ τα άλλα δύο μέλη της εξεταστικής επιτροπής της μεταπτυχιακής μου διατριβής, την Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Ταμπακάκη Αναστασία και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Πανάγου Ευστάθιο, οι οποίοι ανέλαβαν να εκτιμήσουν το έργο που επιτελέστηκε.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων για τις συμβουλές, τις υποδείξεις και τη βοήθεια κατά την εκπόνηση της μεταπτυχιακής διατριβής.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στο Κοινοφελές Ίδρυμα Αλέξανδρος Σ. Ωνάσης για τη χορήγηση υποτροφίας κατά το ακαδημαϊκό έτος 2013-2014 καθώς η οικονομική ενίσχυση του Ιδρύματος μου επέτρεψε να αφοσιωθώ απερίσπαστα στις σπουδές μου.

Τέλος, αν και το ευχαριστώ είναι λίγο για να εκφράσει την ευγνωμοσύνη μου, ευχαριστώ πολύ την οικογένεια μου και τους φίλους μου για τη στήριξη και συμπαράσταση που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

## Περίληψη

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή μελετήθηκε η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Salmonella enterica* serovar Typhimurium σε διάφορα θρεπτικά μέσα ανάπτυξης στους 20°C και στους 10°C. Τα μέσα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το εργαστηριακό υπόστρωμα LB σε υγρή (Broth) και στερεή μορφή (LB Agar) σε μήτρα ανάπτυξης (gel cassette), εκχύλισμα ρόκας σε υγρή και στερεή μορφή και φυτικός ιστός ρόκας. Επιπλέον, μελετήθηκε η γονιδιακή έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το σχηματισμό βιοϋμενίων, παθογένειας και άλλων λειτουργικών ρόλων υπό τις συνθήκες αυτές με την τεχνική αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμέρασης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR). Με βάση τα αποτελέσματα βρέθηκε να υπάρχει αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Salmonella* Typhimurium όταν αναπτύχθηκε σε εκχύλισμα ρόκας (υγρή και στερεή μορφή) και όταν αναπτύχθηκε απευθείας στο φυτικό ιστό στους 20°C και στους 10°C. Αυτή η αναστολή μπορεί να οφείλεται στη στέρηση θρεπτικών συστατικών στα συγκεκριμένα μέσα ανάπτυξης λόγω παραλλακτικότητας του φυτικού ιστού, στη φυσιολογία που παρουσιάζει το κύτταρο και στις αντιμικροβιακές ουσίες που περιέχει ο φυτικός ιστός της ρόκας. Από τον έλεγχο έκφρασης γονιδίων – στόχων βρέθηκε πως ήταν δυνατός ο σχηματισμός βιοϋμενίου στα θρεπτικά μέσα στερεής μήτρας ανάπτυξης, πως η είσοδος του μικροοργανισμού και η προσκόλληση του εντός της φυτικής επιφάνειας πραγματοποιήθηκε ισχυρότερα μέσω των στοματίων του φυτικού ιστού και πως στους 20°C στα δείγματα όπου κυριαρχούσε το βιοϋμένιο υπερεκφράστηκαν τα γονίδια που σχετίζονται με τη διαχείριση καταστάσεων καταπόνησης. Από τα αποτελέσματα αυτά, κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη αναφορικά με την ανάπτυξη και τη γονιδιακή έκφραση των βιοϋμενικών κυττάρων με απώτερο σκοπό την εξάλειψη του συγκεκριμένου παθογόνου βακτηρίου και τη μείωση των τροφιμογενών λοιμώξεων που αυτό προκαλεί.

Λέξεις κλειδιά: βιοϋμένια, σαλμονέλα

## **Abstract**

In the present thesis, the growth of the microorganism *Salmonella enterica* serovar Typhimurium was studied at different growth media at 20°C and at 10°C. The used media were the growth medium LB in liquid (Broth) and solid state (LB Agar) in gel cassette, rocket extract in liquid and solid state and rocket tissue. Furthermore, the expression of genes associated with biofilm formation, pathogenicity and other functional roles in these conditions was investigated using the Real-Time polymerase chain reaction technique (Real Time PCR). Results showed that the growth of the microorganism *Salmonella* Typhimurium is inhibited when developed in rocket extract (liquid and solid state) and when grown directly to rocket tissue at 20°C and at 10°C. This inhibition might be attributed to nutrient starvation to the specific growth media because of plant tissue's variability, cell physiology and antimicrobial compounds of rocket tissue. Gene expression study showed that there was biofilm formation at gel cassettes, that the entrance and adhesion of the microorganism within the plant surface held more strongly through the stomata of the plant tissue and that at 20°C the samples that dominated biofilm form overexpressed genes associated with managing stress situations. From these results, it is indicated that further study on the development and gene expression of biofilm cells is necessary in order to eliminate the specific pathogen and reduce the food-borne diseases it causes.

Keywords: biofilms, Salmonella

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
Abstract .....	5
1. Εισαγωγή.....	10
1.1  Επιδημιολογία.....	11
1.2  Πηγές μόλυνσης τροφίμων φυτικής προέλευσης .....	14
1.3  Συμβολή της μηχανικής καταπόνησης του φυτικού ιστού στη δημιουργία αποικιών από ανθρώπινα παθογόνα .....	19
1.3.1  Θρεπτικοί παράγοντες.....	19
1.3.2  Ενεργότητα νερού .....	21
1.3.3  Ανταγωνισμός .....	22
1.4  Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επίφυτων και των παθογόνων βακτηρίων .....	23
1.5  Μηχανισμός της προσκόλλησης των βακτηρίων στα λαχανικά .....	25
1.5.1  Ενδείξεις παθογόνων βακτηρίων στο εσωτερικό των λαχανικών.....	25
1.5.2  Επιβίωση εντός του φυτικού ιστού <sup>1</sup> .....	26
1.5.3  Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παθογόνων βακτηρίων και των ξενιστών .....	28
1.6  Ο παθογόνος μικροοργανισμός <i>Salmonella</i> spp.....	30
1.6.1  Χαρακτηριστικά του γένους <i>Salmonella</i> .....	31
1.6.2  Ταξινόμηση και Ονοματολογία.....	31
1.6.3  Τρόφιμα που συνδέονται με σαλμονέλλωση .....	32
1.6.4  Χαρακτηριστικά της σαλμονέλλωσης.....	34
1.6.5  Επιδημιολογικά στοιχεία σαλμονέλλωσης.....	35
1.7  Η ρόκα .....	36
1.8  Βιοϋμένια.....	37
1.8.1  Χαρακτηριστικά μικροοργανισμών υπό μορφή βιοϋμενίου .....	38
1.8.2  Βιοϋμένια και απολύμανση .....	41
1.9  Σκοπός της μελέτης .....	42
2. Υλικά και Μέθοδοι .....	43
2.1  Βακτηριακό στέλεχος .....	43
2.2  Συνθήκες ανάπτυξης.....	43
2.3  Προετοιμασία φυτικού ιστού και θρεπτικού υποστρώματος εκχυλίσματος ρόκας...44	

2.4	Προετοιμασία της στερεής μήτρας ανάπτυξης.....	45
2.5	Εμβολιασμός δειγμάτων.....	46
2.5.1	Gel cassettes.....	46
2.5.2	Υγρό θρεπτικό υπόστρωμα.....	47
2.5.3	Φυτικός ιστός.....	48
2.6	Απαρίθμηση Μικροβιακού Πληθυσμού.....	48
2.6.1	Στερεή μήτρα ανάπτυξης (Gel cassettes) και φυτικός ιστός.....	48
2.6.2	Υγρές καλλιέργειες.....	49
2.7	Έλεγχος έκφρασης γονιδίων.....	49
2.7.1	Απομόνωση RNA (RNA extraction).....	49
2.7.2	Μετατροπή RNA σε cDNA (DNA synthesis).....	50
2.7.3	Real Time PCR.....	50
3	Αποτελέσματα.....	52
3.1	Απαρίθμηση Μικροβιακού Πληθυσμού.....	52
3.2	Έλεγχος έκφρασης γονιδίων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμέρασης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR).....	57
4	Συζήτηση.....	61
4.1	Απαρίθμηση Μικροβιακού Πληθυσμού.....	61
4.2	Έλεγχος έκφρασης γονιδίων.....	64
5	Συμπεράσματα.....	69
6	Βιβλιογραφία.....	70

## Περιεχόμενα Πινάκων

<b>Πίνακας 1.1</b> Περιστατικά που σχετίζονται με την κατανάλωση φρέσκων λαχανικών στις Η.Π.Α.....	13
<b>Πίνακας 1.2</b> Παθογόνοι μικροοργανισμοί οι οποίοι βρέθηκαν σε λαχανικά και προκάλεσαν ασθένεια.....	14
<b>Πίνακας 1.3</b> Τα είδη, υποείδη και ορότυποι του γένους <i>Salmonella</i> .....	33
<b>Πίνακας 1.4</b> Παραδείγματα καταγεγραμμένων κρουσμάτων σαλμονέλλωσης.....	34
<b>Πίνακας 2.1</b> Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης.....	44
<b>Πίνακας 2.2</b> Γονίδια στόχοι που αναλύθηκαν με την Real-Time PCR και εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν.....	52

## Περιεχόμενα Γραφημάτων

<b>Γράφημα 1.</b> Καταγεγραμμένες τροφιμογενείς λοιμώξεις στα λαχανικά σύμφωνα με FDA και WHO.....	15
<b>Γράφημα 3.1.1</b> Ανάπτυξη του στελέχους <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium στους 20°C σε δείγματα υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB (LB1, LB2) και εκχυλίσματος ρόκας (R1, R2).....	53
<b>Γράφημα 3.1.2</b> Ανάπτυξη του στελέχους <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium στους 20°C σε δείγματα στερεού θρεπτικού υποστρώματος (Gel Cassette) LB (LBA1, LBA2) και εκχυλίσματος ρόκας (RA1, RA2).....	54
<b>Γράφημα 3.1.3</b> Ανάπτυξη του στελέχους <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium (XLD) στους 20°C σε δείγματα φυτικού ιστού ρόκας από την επιφάνεια (Tissue 1, Tissue 2) και από την πλευρά των στοματίων (Tissue S 1, Tissue S 2) παρουσία της ενδογενούς χλωρίδας (LB). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στις 68 ώρες.....	54
<b>Γράφημα 3.1.4</b> Ανάπτυξη του στελέχους <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium στους 10°C σε δείγματα υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB (LB4, LB5) και εκχυλίσματος ρόκας (R4, R5).....	55
<b>Γράφημα 3.1.5</b> Ανάπτυξη του στελέχους <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium στους 10°C σε δείγματα στερεού θρεπτικού υποστρώματος (Gel cassette) LB (LBA4, LBA5) και εκχυλίσματος ρόκας (RA4, RA5).....	56



<b>Γράφημα 3.1.6</b> Ανάπτυξη του στελέχους <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium (XLD) στους 10°C σε δείγματα φυτικού ιστού ρόκας στην επιφάνεια (Tissue 4, Tissue 5) και στην πλευρά των στοματίων (Tissue S 4, Tissue S 5) παρουσία της ενδογενούς χλωρίδας (LB). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στις 186 ώρες.....	56
<b>Γράφημα 3.1.7</b> Αρχική μικροβιακή χλωρίδα του φυτικού ιστού που χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία των δειγμάτων 20°C και 10°C έπειτα από επώαση στους 37°C και στους 30°C.....	57
<b>Γράφημα 3.2.1</b> Σχετικό επίπεδο έκφρασης των γονιδίων στόχων του στελέχους <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium έπειτα από ανάπτυξη σε υγρό (LB) και στερεό (LBA) θρεπτικό υπόστρωμα LB, υγρό (R) και στερεό υπόστρωμα (RA) ρόκας στην επιφάνεια (tissue) και στην πλευρά των στοματίων φυτικού ιστού ρόκας (tissue S) στις 43 και 68 ώρες στους 20°C.....	59
<b>Γράφημα 3.2.2</b> Σχετικό επίπεδο έκφρασης των γονιδίων στόχων του στελέχους <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium έπειτα από ανάπτυξη σε υγρό (LB) και στερεό (LBA) θρεπτικό υπόστρωμα LB, υγρό (R) και στερεό υπόστρωμα (RA) ρόκας στις 210 και 354 ώρες στους 10°C.....	60

## Περιεχόμενα Εικόνων

<b>Εικόνα 1.1</b> Σχηματική απεικόνιση των παραγόντων που συμβάλλουν στην επιμόλυνση των λαχανικών στον αγρό.....	18
<b>Εικόνα 1.2</b> Περιπτώσεις σαλμονέλωσης και εντερικού πυρετού σε διαφορετικές περιοχές του κόσμου.....	37
<b>Εικόνα 2.1</b> Φύλλα ρόκας.....	45
<b>Εικόνα 2.2</b> Σχέδιο της στερεής μήτρας ανάπτυξης (gel cassettes) για την ανάπτυξη επιφανειακών αποικιών.....	46
<b>Εικόνα 2.3</b> Προετοιμασία της στερεής μήτρας ανάπτυξης (gel cassettes).....	47
<b>Εικόνα 2.4</b> Διαδικασία πλήρωσης της στερεής μήτρας ανάπτυξης.....	48
<b>Εικόνα 2.5</b> Δείγμα υγρού θρεπτικού υποστρώματος ρόκας.....	48

## 1. Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια τα φρέσκα λαχανικά καταναλώνονται σε μεγάλη κλίμακα παγκοσμίως και αποτελούν σημαντικά συστατικά για μια υγιή και ισορροπημένη διατροφή λόγω της υψηλής περιεκτικότητας τους σε θρεπτικά συστατικά και βιταμίνες. Η κατανάλωση τους ενθαρρύνεται σε πολλές χώρες από διάφορους οργανισμούς υγείας λόγω της προστασίας που παρέχουν ενάντια σε πολλές ασθένειες όπως είναι ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις. Ωστόσο, τα λαχανικά και πιο συγκεκριμένα τα πράσινα φυλλώδη λαχανικά τα οποία καταναλώνονται φρέσκα θεωρούνται σημαντικό μέσο μετάδοσης παθογόνων μικροοργανισμών με αποτέλεσμα να υπάρχει σημαντική αύξηση περιστατικών που σχετίζονται με την κατανάλωση αυτών. Αυτή η έξαρση μπορεί να οφείλεται σε αλλαγές κατά την ατομική κατανάλωση, σε αυξημένη ένταση κτηνοτροφικής παραγωγής κοντά σε περιοχές μαζικής καλλιέργειας λαχανικών, στη μεγάλη διαθεσιμότητα των λαχανικών παγκοσμίως ακόμα και από χώρες περιορισμένης υγιεινής πρακτικής και στον αυξημένο αριθμό των ανοσοκατεσταλμένων καταναλωτών (Berger et al., 2010).

Από τη στιγμή που τα περισσότερα λαχανικά υφίστανται ελάχιστη επεξεργασία και συχνά καταναλώνονται ωμά, η επιμόλυνση από παθογόνους μικροοργανισμούς παρουσιάζει υψηλό επίπεδο επικινδυνότητας. Επιπρόσθετα, ο τεμαχισμός και το ξεφλούδισμα των λαχανικών καταστρέφουν το φυτικό ιστό με αποτέλεσμα να απελευθερωθούν θρεπτικά συστατικά τα οποία διευκολύνουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Μικροβιακή επιμόλυνση μπορεί να προκληθεί σε οποιοδήποτε στάδιο της τροφικής αλυσίδας από το χωράφι μέχρι το τραπέζι του καταναλωτή (farm to fork). Οι πηγές επιμόλυνσης μπορεί να είναι περιβαλλοντικής, ζωικής ή ανθρώπινης προέλευσης. Υπάρχουν πολλοί τρόποι μείωσης του μικροβιακού πληθυσμού. Πιο συνηθισμένος τρόπος θεωρείται το πλύσιμο με χλωρίνη ή με άλλα οργανικά οξέα μετά τη συγκομιδή, όμως η αποτελεσματικότητα αυτής της μεθόδου επηρεάζεται από παράγοντες όπως είναι ο σχηματισμός βιοϋμενίων από τα βακτήρια, η είσοδος των μικροοργανισμών εντός του φυτικού ιστού καθώς και η υδροφοβία που παρουσιάζουν οι φυτικές επιφάνειες. Εναλλακτικές μέθοδοι αποτελούν η ακτινοβολήση, η εφαρμογή βακτηριοφάγων και ανταγωνιστικών βακτηρίων ή ο συνδυασμός αυτών (Olaimat et al., 2012).

Υπάρχουν περιορισμένες πληροφορίες αναφορικά με το στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας όπου πραγματοποιείται η επιμόλυνση ή αναφορικά με το μηχανισμό που οι

παθογόνοι μικροοργανισμοί δημιουργούν αποικίες και επιβιώνουν εξωτερικά ή εσωτερικά στα λαχανικά.

## 1.1 Επιδημιολογία

Οι τροφιμογενείς λοιμώξεις αποτελούν κύρια ανησυχία για τη δημόσια υγεία παγκοσμίως αναφορικά με τον αριθμό των ατόμων που προσβάλλονται και το οικονομικό κόστος που αυτές επιφέρουν. Οι τελευταίες δεκαετίες χαρακτηρίζονται από εξελίξεις που μπορεί να εξηγήσουν σε σημαντικό βαθμό την αύξηση της συχνότητας εμφάνισης των τροφιμογενών νοσημάτων. Τέτοιοι παράγοντες είναι:

- η εισαγωγή νέων πρακτικών στην εκτροφή των ζώων και οι αλλαγές στην κτηνοτροφία που στοχεύουν στην αύξηση της παραγωγής
- οι αλλαγές στις γεωπονικές διαδικασίες και η χρήση χημικών ουσιών για τη βελτίωση της ποιότητας και ποσότητας της παραγωγής
- οι αλλαγές στην τεχνολογία των τροφίμων και στις διαδικασίες επεξεργασίας και συσκευασίας
- οι αλλαγές στον τρόπο ζωής, όπως αύξηση των ταξιδιών σε διεθνές επίπεδο και συχνή κατανάλωση τροφίμων εκτός του οικιακού περιβάλλοντος
- η αύξηση του διεθνούς εμπορίου με συνέπεια τη μεταφορά μικροοργανισμών από τη μια χώρα στην άλλη, την αύξηση του χρόνου μεταξύ προετοιμασίας και κατανάλωσης των τροφίμων και την έκθεση του πληθυσμού σε μεγαλύτερο αριθμό στελεχών/τύπων των παθογόνων που προκαλούν τροφιμογενή νοσήματα
- η αύξηση του αριθμού των ατόμων που ανήκουν σε ευπαθείς ομάδες του πληθυσμού, κυρίως λόγω της αύξησης του μέσου όρου ζωής και της αύξησης του ποσοστού των ανοσοκατασταλμένων ατόμων
- οι κλιματικές αλλαγές όπως το φαινόμενο της υπερθέρμανσης και οι αλλαγές που αυτό επιφέρει.

Παράλληλα, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση της καταγραφής των τροφιμογενών νοσημάτων λόγω:

- της βελτίωσης των διαγνωστικών εργαστηριακών εξετάσεων που επιτρέπουν την αναγνώριση παθογόνων που στο παρελθόν ήταν άγνωστα ή δύσκολο να ανεβρεθούν

- της βελτίωσης των συστημάτων επιτήρησης των νοσημάτων και της ευαισθητοποίησης των κλινικών και εργαστηριακών γιατρών όσον αφορά την καταγραφή
- της ευαισθητοποίησης του κοινού σε θέματα που άπτονται της ασφάλειας των τροφίμων

Τις τελευταίες δεκαετίες η συχνότητα ασθενειών που σχετίζονται με την κατανάλωση νωπών λαχανικών έχει αυξηθεί με ταχύτατους ρυθμούς λόγω της αυξημένης ζήτησης για φρέσκα προϊόντα (Mead et al., 1999; Olaimat et al., 2012).

**Πίνακας 1.1** Περιστατικά που σχετίζονται με την κατανάλωση φρέσκων λαχανικών στις Η.Π.Α (Brandl, 2006).

Προϊόν	<i>S. enterica</i>	Παθογενές <i>E. coli</i>	<i>Shigella spp.</i>	<i>Campylobacter spp.</i>
Φρούτα <sup>b</sup>	32 (76) <sup>c</sup>	8 (19)	1 (2)	1 (2)
Φυλλώδη λαχανικά	8 (30)	13 (48)	3 (11)	3 (11)
Φύτρα	9 (60)	6 (40)	0	0
Σύνολο	49	27	4	4

<sup>a</sup> Τα στοιχεία είναι συγκεντρωμένα από διάφορες πηγές. (21, 48, 156, 157, 159). Αυτές οι πηγές δεν αναφέρουν κρούσματα από μεμονωμένα προϊόντα φρέσκων λαχανικών που προκλήθηκαν από τους μικροοργανισμούς *S. aureus*, *L. monocytogenes* ή *Y. enterocolitica* στις Η.Π.Α κατά τη συγκεκριμένη χρονική περίοδο.

<sup>b</sup> Περιλαμβάνει κρούσματα από χυμούς φρούτων

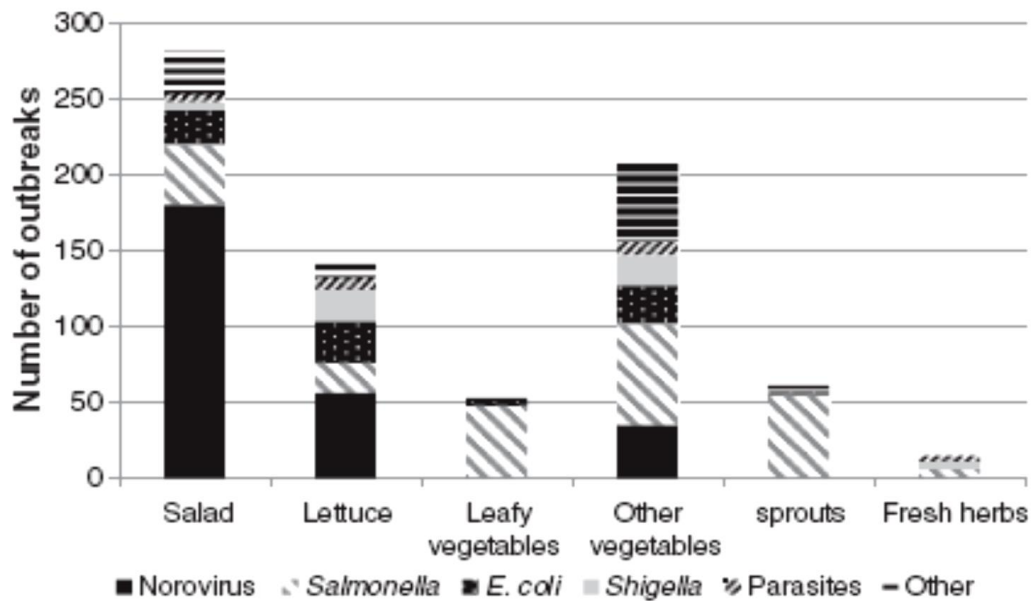
<sup>c</sup> Ποσοστό περιστατικών που προκλήθηκαν από συγκεκριμένο παθογόνο σε μια συγκεκριμένη κατηγορία προϊόντος

Τα φυλλώδη λαχανικά μπορεί να μολυνθούν από ιούς, παράσιτα και παθογόνα βακτήρια. Οι ιοί που μπορεί να προκαλέσουν ανησυχία είναι ο ιός της ηπατίτιδας Α και ο norovirus και από τα πρωτόζωα είναι το *Cyclospora cayetanensis* και *Cryptosporidium parvum*. Τα βακτήρια που προκαλούν ανησυχία για τη δημόσια υγεία ανήκουν στα είδη *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Clostridium spp.*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter spp.* και *Yersinia enterocolitica*. Αξίζει να σημειωθεί πως οι παθογόνοι μικροοργανισμοί *Salmonella spp.* και *Escherichia coli* O157:H7 προκαλούν περιστατικά με υψηλή συχνότητα που σχετίζονται με την κατανάλωση νωπών λαχανικών. Ο χρόνος επιβίωσης των κολοβακτηριδίων και των παθογόνων βακτηρίων στα περισσότερα νωπά λαχανικά εξαρτάται από την υγρασία και τη θερμοκρασία στην οποία εκτίθενται. Σε 1100 καταγεγραμμένα

κρούσματα που σχετίζονται με την κατανάλωση νεπών λαχανικών και στα οποία ταυτοποιήθηκε ο αιτιολογικός παράγοντας βρέθηκε ότι το 53% προκλήθηκε από βακτήρια, το 42,5% προκλήθηκε από ιούς και το 4,5% προκλήθηκε από παράσιτα (Ramos et al., 2013).

**Πίνακας 1.2** Παθογόνοι μικροοργανισμοί οι οποίοι βρέθηκαν σε λαχανικά και προκάλεσαν ασθένεια (Beuchat, 1998)

<b>Παθογόνος μικροοργανισμός</b>	<b>Τρόφιμο</b>	<b>Αναφορά</b>
<i>Bacillus cereus</i>	Sprouts	Portnoy et al. (1976)
<i>Campylobacter</i> sp.	Αγγούρι	Kirk et al. (1997)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Μαρούλι	CDC (1998)
<i>Clostridium botulinum</i>	Σαλάτα λαχανικών	PHLS (1978)
<i>Escherichia coli</i> O157	Ραδίκι	WHO (1996)
<i>Escherichia coli</i> O157	Μαρούλι	CDC (1997)
<i>Giardia</i> sp.	Καρότο	Mints et al. (1992)
<i>Salmonella</i> Agona	Λάχανο και κρεμμύδι	Clark et al. (1973)
<i>Salmonella</i> Thompson	Ρίζες λαχανικών	Kano et al. (1996)
<i>Shigella flexneri</i>	Μίγμα σαλάτας	Dunn et al. (1995)
<i>Shigella sonnei</i>	Μαρούλι iceberg	Kapperudet et al. (1995)



**Γράφημα 1.** Καταγεγραμμένες τροφιμογενείς λοιμώξεις στα λαχανικά σύμφωνα με FDA και WHO (Ramos et al., 2013)

Η κατανόηση των αιτιών που οδηγούν στην αύξηση των προϊόντων που ευθύνονται για τροφιμογενείς λοιμώξεις στο σύνολο θα μπορούσε να είναι μια σημαντική προσέγγιση για τα μέτρα που πρέπει να ληφθούν ώστε να αναστραφεί αυτή η τάση.

## 1.2 Πηγές μόλυνσης τροφίμων φυτικής προέλευσης

Η μικροχλωρίδα των φρέσκων φρούτων και λαχανικών συνήθως δεν αποτελείται από παθογόνους για τον άνθρωπο μικροοργανισμούς και είναι πιθανόν να βρίσκεται ακόμα στο προϊόν την στιγμή της κατανάλωσης. Ωστόσο, κατά την ανάπτυξη, τη συγκομιδή, τη μεταφορά και την περαιτέρω επεξεργασία, τα νωπά λαχανικά μπορεί να επιμολυνθούν από ανθρώπινης, περιβαλλοντικής ή ζωικής προέλευσης παράγοντες. Για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια του τεμαχισμού του φυτικού ιστού η επιφάνεια του προϊόντος εκτίθεται στον αέρα και ενδέχεται να επιμολυνθεί από βακτήρια, ζύμες ή/και μούχλες. Αυτό μπορεί να συμβεί γιατί το επιδερμικό προστατευτικό εμπόδιο διαρρηγνύεται, αυξάνεται η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών και δημιουργούνται μεγάλες επιφανειακές περιοχές που διευκολύνουν τη μικροβιακή ανάπτυξη και συνεπώς μειώνουν τη διάρκεια ζωής του προϊόντος. Επιπλέον, η

μηχανική καταπόνηση που υφίστανται τα φυτικά κύτταρα κατά την επεξεργασία αυξάνει το ρυθμό γήρανσης των ιστών μειώνοντας την αντοχή τους στη μικροβιακή αλλοίωση (Ramos et al., 2013).

Ανησυχία αποτελεί και ο ενδεχόμενος σχηματισμός βιοϋμενίων στους φυτικούς ιστούς από τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια που επιτρέπει την επιβίωση αυτών σε δυσμενή περιβάλλοντα και μειώνει την αποτελεσματικότητα των χρησιμοποιούμενων απολυμαντικών. Συνεπώς, τα προϊόντα αυτά μπορεί να αποτελέσουν μέσο διαβίβασης βακτηριακών, παρασιτικών και ιογενών παθογόνων τα οποία είναι ικανά να βλάψουν τη δημόσια υγεία (Ramos et al., 2013).

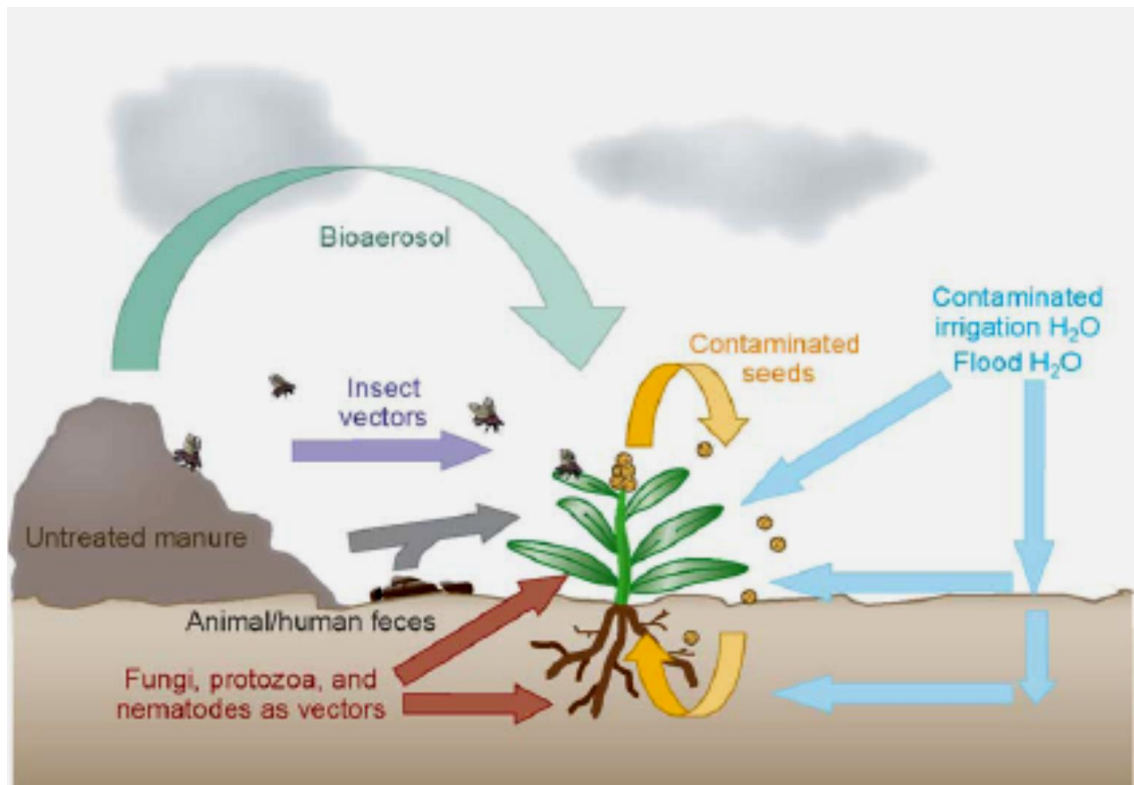
Πολυάριθμες μελέτες έχουν διερευνήσει τις πιθανές πηγές επιμόλυνσης των νωπών λαχανικών στην τροφική αλυσίδα και συγκεκριμένα για τα στάδια πριν αλλά και μετά τη συγκομιδή. Πριν τη συγκομιδή παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να ανιχνευτούν στο περιβάλλον που καλλιεργούνται τα φυτά. Οι πηγές επιμόλυνσης πριν από τη συγκομιδή περιλαμβάνουν το έδαφος, τα περιττώματα των ζώων, το νερό άρδευσης, τα ανασυσταθέντα μυκητοκτόνα και εντομοκτόνα, τη σκόνη, τα έντομα, την ανεπαρκώς κομποστοποιημένη κοπριά, τα άγρια ή κατοικίδια ζώα και τον ανθρώπινο χειρισμό. Ο κίνδυνος αυτός μπορεί να ενισχυθεί μετά τη συγκομιδή είτε με περαιτέρω άμεση μόλυνση είτε από τον πολλαπλασιασμό των υφιστάμενων παθογόνων πληθυσμών κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και του χειρισμού μετά τη συγκομιδή (Berger et al., 2010). Ο ανθρώπινος χειρισμός μπορεί να συμβάλει στη επιμόλυνση και μετά τη συγκομιδή, μαζί με τον εξοπλισμό συγκομιδής, τα μέσα μεταφοράς, τα έντομα, τη σκόνη, το νερό ξεπλύματος, τον πάγο, τα οχήματα και τον εξοπλισμό επεξεργασίας (Beuchat et al., 2002).

Το νερό θεωρείται ότι είναι πιθανό να αποτελέσει μια σημαντική πηγή επιμόλυνσης, εφόσον έχει επιμολυνθεί από διάφορους παράγοντες. Πιθανές πηγές του νερού είναι οι απορροές από τα κοντινά λιβάδια των ζώων και η άρδευση από μια μολυσμένη πηγή. Ο κίνδυνος που σχετίζεται με τη χρήση νερού από διάφορες πηγές που ποικίλουν σε μικροβιολογική ποιότητα για την άρδευση των προϊόντων έχει αξιολογηθεί και έχει αναγνωριστεί η ανάγκη για βελτίωση των κατευθυντήριων γραμμών. Ενώ σε μελέτες δεν βρέθηκε είσοδος του *E. coli* O157:H7 σε φυτικό ιστό σπανακιού που καλλιεργούταν σε μολυσμένο χώμα, βρέθηκε πρόσληψη και εσωτερικήυση του ίδιου του παθογόνου σε σπανάκι μετά από διαβροχή των φύλλων με μολυσμένο νερό. Αυτό υποδηλώνει μια μικρότερη πιθανότητα μετάδοσης παθογόνων μικροοργανισμών από το μολυσμένο νερό όταν πραγματοποιείται στάγδην άρδευση παρά όταν χρησιμοποιούνται εναέρια συστήματα καταιονισμού. Ωστόσο, η άρδευση δεν είναι η μόνη αναφερόμενη οδός μόλυνσης που

συνδέεται με το νερό. Η χρήση του νερού στην επεξεργασία μετά τη συγκομιδή έχει παίξει επίσης σημαντικό ρόλο (Berger et al., 2010).

Το έδαφος θεωρείται το φυσικό περιβάλλον μιας ποικιλίας ανθρώπινων παθογόνων μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένων των *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* και *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* και *Aeromonas* sp. Στα είδη αυτά μπορούν να συμπεριληφθούν και άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί εάν λάβουμε υπόψη τα περιττώματα των ζώων στο έδαφος. Έχει αναφερθεί ότι οι μικροοργανισμοί *E. coli* O157: H7 και *Salmonella* spp. μπορούν να επιβιώσουν στο έδαφος από 7 έως 25 εβδομάδες ανάλογα με τον τύπο του εδάφους, το επίπεδο της υγρασίας και της θερμοκρασίας καθώς και την πηγή μόλυνσης. Έχει αποδειχτεί από μια πληθώρα εργασιών ότι αυτά τα ζωνοσογόνα παθογόνα επιβιώνουν περισσότερο σε υγρά και αργιλώδη εδάφη και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες με την παρουσία κοπριάς. Οι συνθήκες που επικρατούν στον τόπο καλλιέργειας αποτελούν σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει τη μικροβιακή ασφάλεια των νωπών λαχανικών. Τα αγροτεμάχια που περιέχουν κοπριά είναι πιο πιθανό να έχουν επιμολυνθεί με εντερικά παθογόνα λόγω της ικανότητάς τους να επιβιώσουν στο έδαφος για μήνες ή ακόμα και για χρόνια. Η κοπριά των μηρυκαστικών (βοοειδή και πρόβατα) και τα λύματα θεωρούνται ως οι κύριες πηγές επιμόλυνσης από *Salmonella* και *E. coli* O157: H7. Επίσης, ο μικροοργανισμός *Campylobacter jejuni* είναι ένα φυσιολογικό μέλος της γαστρεντερικής μικροχλωρίδας των πουλερικών, των χοίρων και των βοοειδών. Τα λαχανικά, ιδιαίτερα οι ρίζες αυτών, επιμολύνονται συχνά από το μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes* εφόσον είναι πολύ διαδεδομένος στη φύση (Olaimat et al., 2012).





**Εικόνα 1.1** Σχηματική απεικόνιση των παραγόντων που συμβάλλουν στην επιμόλυνση των λαχανικών στον αγρό (Brandl, 2006).

Κατά τη συγκομιδή τα λαχανικά μπορεί να μολυνθούν με παθογόνα εάν χρησιμοποιηθεί γεωργικός εξοπλισμός που δεν έχει απολυμανθεί επαρκώς ή σε περίπτωση που από τους αγρότες δεν τηρούνται οι ορθές γεωργικές πρακτικές (Good Agricultural Practices) (Matthews, 2006).

Πιθανή πηγή επιμόλυνσης αποτελεί επίσης η επεξεργασία μετά τη συγκομιδή η οποία αναφέρεται από την αποθήκευση μέχρι και τον τεμαχισμό των λαχανικών. Στην επιφάνεια που έχει κοπεί το λαχανικό μπορούν εύκολα να αναπτυχθούν διάφορα παθογόνα βακτήρια, όπως είναι το παθογόνο *Salmonella*, εφόσον θρεπτικά συστατικά μπορεί να έχουν εξέλθει από σημεία τραυματισμού του φυτικού ιστού στο στάδιο αυτό. Σε ένα επόμενο στάδιο, τα περισσότερα λαχανικά πλένονται τουλάχιστον μία φορά, όπου το νερό μπορεί να αποτελέσει ακόμη μια φορά πηγή επιμόλυνσης. Στις περισσότερες βέβαια βιομηχανίες το νερό που χρησιμοποιείται για το πλύσιμο των λαχανικών περιέχει απολυμαντικό. Η προσθήκη αυτή του απολυμαντικού πραγματοποιείται για τον έλεγχο του μικροβιακού φορτίου του προϊόντος αλλά και του νερού που χρησιμοποιείται. Μερικές φορές όμως, μπορεί να γίνει χρήση πάγου κατά την επεξεργασία των λαχανικών, που μπορεί να αποτελέσει μια επιπλέον πηγή επιμόλυνσης.

Σημαντικότερη πηγή επιμόλυνσης κατά την επεξεργασία των λαχανικών μπορεί να αποτελέσει ο εξοπλισμός που έρχεται σε άμεση επαφή με το προϊόν, ο οποίος πρέπει να απολυμαίνεται τακτικά. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται από τους παραγωγούς στα προϊόντα τα οποία καταναλώνονται νωπά (fresh-cut produce), όπως είναι οι προσσκευασμένες σαλάτες. Οι καταναλωτές προσδοκούν αυτά τα προϊόντα να μην απαιτούν περαιτέρω πλύσιμο πριν καταναλωθούν. Αυτή η προσδοκία αποτελεί πρόκληση για τον παρασκευαστή ώστε να διασφαλίσει την εξυγίανση αυτών των προϊόντων, ειδικά εάν ληφθεί υπόψη και ο όγκος που διατίθεται καθημερινώς. Για την επίτευξη της ασφάλειας των νωπών λαχανικών στο βιομηχανικό τομέα απαιτείται η εφαρμογή Ορθών Βιομηχανικών Πρακτικών, ενός προγράμματος εξυγίανσης και η ανάπτυξη και τήρηση ενός Συστήματος HACCP (Matthews, 2006). Επιπρόσθετα, αναγκαία κρίνεται η εύρεση νέων τεχνολογικών μεθόδων που αυξάνουν την ασφάλεια και τη διάρκεια ζωής των νωπών λαχανικών.

Τέλος, επιμόλυνση μπορεί να πραγματοποιηθεί κατά την προετοιμασία των νωπών λαχανικών είτε στο σπίτι είτε σε κάποιο εστιατόριο. Δεδομένου ότι τα περισσότερα λαχανικά καταναλώνονται δίχως καμία θερμική επεξεργασία, η ελλειπής προσωπική υγιεινή του καταναλωτή ή των εργαζομένων μπορεί να οδηγήσει στη διάδοση ιών ή παθογόνων βακτηρίων στο προϊόν. Κάθε χρόνο χιλιάδες είναι οι περιπτώσεις τροφιμογενών λοιμώξεων που δεν καταγράφονται και που σχετίζονται με την κατανάλωση νωπών λαχανικών. Πολλά από αυτά τα κρούσματα είναι αποτέλεσμα ακατάλληλης προετοιμασίας του φαγητού στο σπίτι. Για παράδειγμα, είναι πιθανό να συμβεί διασταυρούμενη επιμόλυνση από τους μικροοργανισμούς *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Campylobacter* sp. και *Vibrio* sp., τα οποία σχετίζονται με νωπό κρέας, πουλερικά και θαλασσινά, κατά την προετοιμασία κάποιας σαλάτας ή ενός σάντουιτς. Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για την κοπή του νωπού κρέατος ή των θαλασσινών πρέπει να πλένεται πολύ καλά πριν χρησιμοποιηθεί για τον τεμαχισμό κάποιου λαχανικού. Για την εξάλειψη αυτών των περιστατικών θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή κατά την προετοιμασία του προϊόντος ώστε να μειωθούν οι μικροβιολογικοί κίνδυνοι (Matthews, 2006).

### **1.3 Συμβολή της μηχανικής καταπόνησης του φυτικού ιστού στη δημιουργία αποικιών από ανθρώπινα παθογόνα**

Η επιδερμίδα των λαχανικών καλύπτεται με κερί που καθιστά δύσκολη την προσκόλληση των μικροοργανισμών στους ιστούς των φυτών. Αυτό το στρώμα απωθεί το νερό που μπορεί να περιέχει μικρόβια τα οποία μπορούν να μεταναστεύσουν στο λαχανικό και προστατεύει τα φυτά από περιβαλλοντικές πιέσεις. Για να επιτευχθεί προσκόλληση των μικροοργανισμών πρέπει να διαπεραστεί πρώτα η επιδερμίδα, για αυτό στα λαχανικά που έχουν υποστεί κάποια καταπόνηση ανιχνεύονται περισσότερα παθογόνα από ότι σε αυτά που είναι ακέραια. Θεωρείται πως ένας ιστός που έχει υποστεί καταπόνηση μπορεί να ενισχύσει το μικροβιακό πολλαπλασιασμό με δύο τρόπους: πρώτον, στον ιστό είναι πιο εύκολη η δημιουργία αποικιών από τα παθογόνα βακτήρια λόγω των αλλαγών στο μικροπεριβάλλον και δεύτερον οι συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος μπορούν να αλλάξουν ανεξάρτητα από το βακτηριακό αποικισμό λόγω δράσης κάποιου ενζύμου ή λόγω διαρροής θρεπτικών στοιχείων (Arucsavage et al., 2006).

#### **1.3.1 Θρεπτικοί παράγοντες**

Εφόσον οι μικροοργανισμοί *Esherichia coli* O157 και *Salmonella* spp., που παροδικά μπορούν να βρεθούν στη φυλλόσφαιρα, πολλαπλασιάζονται περισσότερο στα τραυματισμένα λαχανικά από ότι στα υγιή λαχανικά, κρίνεται λογικό ότι υπάρχει μια οικολογική διαταραχή στην τραυματισμένη επιφάνεια των λαχανικών που ευνοεί αυτό το φαινόμενο. Οι επιφυτικοί μικροοργανισμοί (epiphytic microorganisms) που συνήθως υπάρχουν κάτω από δυσμενείς συνθήκες καταναλώνουν θρεπτικά συστατικά που εκχυλίζονται από τα λαχανικά για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους. Η μέτρηση της κατανάλωσης του άνθρακα μπορεί να καθορίσει τη δομή μιας μικροβιακής κοινότητας στη φυλλόσφαιρα. Η κατανόηση των αλληλεπιδράσεων στην επίφυτη μικροχλωρίδα συντελεί στην κατανόηση του τρόπου που τα ανθρώπινα παθογόνα συμπεριφέρονται στη φυλλόσφαιρα (Arucsavage et al., 2006).

Ο μέσος επίφυτος αερόβιος βακτηριακός πληθυσμός είναι περίπου  $10^5$ - $10^7$  cfu/g φυτικού ιστού (Mercier et al., 2000). Μελέτες έχουν δείξει πως ένα φυλλώδες λαχανικό όπως είναι το μαρούλι έχει βακτηριακό πληθυσμό περίπου  $10^5$  cfu/g φυτικού ιστού. Δεν είναι όλοι οι μικροοργανισμοί ικανοί να προσαρμοστούν και να επιβιώσουν στις συνθήκες που επικρατούν στη φυλλόσφαιρα. Η πιο κοινή ομάδα επιφυτικών μικροοργανισμών στη φυλλόσφαιρα των

λαχανικών είναι τα Gram αρνητικά βακτήρια. Οι αποικίες που δημιουργούνται δεν είναι κατανοημένες ομοιόμορφα σε όλη τη φυλλική επιφάνεια αλλά συσσωρεύονται σε συγκεκριμένες περιοχές. Συνήθως, τα βακτήρια αποικούν στη βάση των τριχιδίων γύρω από τα στομάτια και κατά μήκος των νεύρων των φύλλων. Αυτές οι περιοχές παρέχουν τις καλύτερες συνθήκες για να πολλαπλασιαστούν τα επίφυτα βακτήρια καθώς διαβρέχονται καλύτερα από άλλες περιοχές αυξάνοντας έτσι τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών και νερού. Η γνώση των θρεπτικών συστατικών που εκχυλίζονται καθώς και πως αυτά γίνονται διαθέσιμα στα βακτήρια μπορεί να βοηθήσει στη δημιουργία παραγόντων βιοελέγχου των ανθρώπινων παθογόνων στα νωπά λαχανικά (Brandl et al., 2006).

Οι κύριοι υδατάνθρακες που εκχυλίζονται από την επιφάνεια των λαχανικών είναι η γλυκόζη, η σακχαρόζη και η φρουκτόζη (Mercier et al., 2000). Σύμφωνα με Brandl (2006), οι μικροοργανισμοί στην περιοχή της ριζόσφαιρας είναι σε μεγαλύτερο πληθυσμό κοντά στις άκρες της ρίζας όπου η υψηλότερη συγκέντρωση της σακχαρόζης διαχέεται στο έδαφος. Από τα λαχανικά εκρέουν επίσης μέταλλα, αμινοξέα, αλκοόλες σακχάρων, πηκτικές ουσίες, ορμόνες πολλαπλασιασμού και βιταμίνες. Αυτά τα εκχυλίσματα παρέχουν τις πηγές άνθρακα και αζώτου για την μικροβιακή χλωρίδα που υπάρχει πάνω ή μέσα στο φυτικό ιστό. Είναι πιθανό ότι αφού τα βακτήρια προσκολληθούν, πολλαπλασιάζονται σε περιοχές γύρω από αυτές τις πηγές θρεπτικών συστατικών. Η ποσότητα και το είδος των ουσιών που εκκρίνονται ποικίλει μεταξύ των φυτών. Μερικά λαχανικά απελευθερώνουν περισσότερα θρεπτικά συστατικά από άλλα, γεγονός που επηρεάζει το μέγεθος του βακτηριακού πληθυσμού που θα σχηματίσει αποικίες (Aruscavage et al., 2006).

Τα πολύ νεαρά και αναπτυσσόμενα φύλλα απελευθερώνουν περιορισμένες ποσότητες θρεπτικών στοιχείων σε σύγκριση με εκείνα που είναι κοντά στη φάση γήρανσης. Οι Jacques και Morris (1995) παρατήρησαν μεγαλύτερη μικροβιακή ανάπτυξη σε γηρασμένα φύλλα αντιδίου από ότι σε νεαρά εσωτερικά φύλλα. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί προκάλεσαν περισσότερη γήρανση σε αυτά τα παλιά φύλλα παρά στα νεαρά φύλλα, συμβάλλοντας έτσι περαιτέρω στην απελευθέρωση θρεπτικών στοιχείων και σε άλλες μικροπεριβαλλοντικές αλλαγές στη φυτική επιφάνεια που ευνοούν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων παθογόνων (Jacques et al., 1995).

Ο τραυματισμός των φύλλων επίσης αυξάνει την έκκριση ουσιών από τα φύλλα. Υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι ο τραυματισμένος ιστός είναι πιο πιθανό να επηρεάσει θετικά τον πολλαπλασιασμό του *E. coli* O157 από τον υγιή ιστό, με το είδος του τραυματισμού να μπορεί να αποτελέσει σημαντικό παράγοντα. Με ομοεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης αποδείχθηκε ότι το *E. coli* O157 προσδέθηκε στο φυτικό ιστό μαρουλιού πιο

εύκολα στις κομμένες άκρες παρά στον ακέραιο φυτικό ιστό του μαρουλιού. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην ανικανότητα ορισμένων παθογόνων να διαπεράσουν την επιδερμίδα, κάτι που είναι απαραίτητο για να επιτευχθεί προσκόλληση (Beattie, 2002).

Η επιβίωση των μικροοργανισμών στη φυλλόσφαιρα είναι συχνά περιορισμένη λόγω της διαθεσιμότητας των πηγών άνθρακα και αζώτου που εκκρίνονται από το φυτό. Έπειτα από μέτρηση σε αρκετά δείγματα λαχανικών η συγκέντρωση των υδατανθράκων κυμαίνεται από 3,4 έως 74  $\mu\text{g} / \text{mL}$  και των αμινοξέων από 3,0 έως 52  $\mu\text{g} / \text{mL}$  εκκρίματος. Τα λαχανικά δεν αναπληρώνουν με τον ίδιο ρυθμό αυτά τα θρεπτικά συστατικά, έτσι ο ανταγωνισμός μεταξύ των μικροοργανισμών για τα θρεπτικά συστατικά θεωρείται κρίσιμος για την επιβίωση των επίφυτων μικροοργανισμών. Η διαθεσιμότητα των υδατανθράκων δεν είναι ομοιόμορφη στο φυτικό ιστό, έτσι όταν εξαντληθούν σε κάποιο σημείο η ταχεία εξάπλωση των επίφυτων μικροοργανισμών συνήθως σταματά (Aruscavage et al., 2006).

Ο τύπος και η ποσότητα των εκκρίσεων που απελευθερώνονται από τα λαχανικά αποτελούν περιοριστικούς παράγοντες για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των επίφυτων μικροοργανισμών. Η ικανότητα των μικροοργανισμών της επιφάνειας του φύλλου να βρουν και να χρησιμοποιήσουν αυτά τα θρεπτικά συστατικά είναι πολύ καθοριστικός παράγοντας για την επίφυτη προσαρμογή. Συγκεκριμένα, για τους φυσικούς επίφυτους μικροοργανισμούς ο περιοριστικός παράγοντας για τον πολλαπλασιασμό είναι το άζωτο, όμως δεν είναι γνωστό εάν το άζωτο είναι ένας περιοριστικός παράγοντας και για τα εντερικά παθογόνα, καθώς επειδή είναι ένα περιστασιακό είδος στη φυλλόσφαιρα, μπορούν να χρησιμοποιήσουν για τον πολλαπλασιασμό τους πηγές άνθρακα και αζώτου που συνήθως δεν χρησιμοποιούνται από τους επίφυτους. Είναι απαραίτητο να είναι γνωστό τι απελευθερώνεται από το φυτικό ιστό και τι από αυτά μπορούν να δώσουν στα εντερικά παθογόνα ένα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα όταν αυτά βρίσκονται σε λαχανικά που σχετίζονται με την πρόκληση τροφολοίμωξης (Aruscavage et al., 2006).

### **1.3.2 Ενεργότητα νερού**

Πειράματα έχουν δείξει ότι τα επίφυτα βακτήρια αναπτύσσονται καλύτερα στις περιοχές του φυτικού ιστού με τη μεγαλύτερη ενεργότητα νερού. Το μέγεθος του πληθυσμού και η κατανομή του στη φυλλόσφαιρα μπορεί να επηρεαστεί από την ποσότητα του χρησιμοποιήσιμου νερού που υπάρχει στην επιφάνεια του φύλλου. Υπάρχουν ενδείξεις ότι υψηλή σχετική υγρασία αυξάνει το βακτηριακό πληθυσμό της επιφάνειας του φύλλου,

επομένως εκτός από τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών και το νερό αποτελεί παράγοντα που επηρεάζει το βακτηριακό πολλαπλασιασμό στη φυλλόσφαιρα.

Μερικά επίφυτα βακτήρια μπορούν να απελευθερώσουν βιο-τασιενεργές ουσίες που μεταβάλλουν τη διαβρεξιμότητα του φύλλου με τρόπο που καθιστά ευκολότερη τη χρήση του νερού από αυτούς. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι ακόμη και αφότου αυτοί οι μικροοργανισμοί έχουν μειωθεί στην επιφάνεια του φύλλου, η βιο-τασιενεργή δραστηριότητα συνεχίζεται. Έτσι, η ενεργότητα νερού εξακολουθεί να είναι υψηλή για τα εναπομείναντα βακτήρια. Αυτό είναι σημαντικό θέμα για την ασφάλεια των λαχανικών διότι τα λαχανικά που προηγουμένως έχουν επιμολυνθεί από παθογόνα που είναι ικανά να παράγουν βιοτασιενεργά έχουν αυξημένη ικανότητα να διαβρέχουν τα φύλλα γεγονός που ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των εντερικών παθογόνων που έρχονται σε επαφή με αυτά τα λαχανικά (Aruscavage et al., 2006).

### 1.3.3 Ανταγωνισμός

Ένας μικροοργανισμός που αναπτύσσεται γρήγορα μπορεί να αποκτήσει ανταγωνιστικό πλεονέκτημα στην περίπτωση που μπορεί να κυριαρχήσει όταν οι συγκεντρώσεις των θρεπτικών στοιχείων είναι υψηλές ή όταν μπορεί να αναπτυχθεί όταν επικρατούν χαμηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών συστατικών. Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν διαφορετικές πηγές άνθρακα και ενέργειας, έτσι οι μικροβιακοί πληθυσμοί μπορούν στην πραγματικότητα να συμβιώσουν στη φυλλόσφαιρα και να ενισχύσουν τη φυσική κατάσταση των υπόλοιπων επίφυτων πληθυσμών. Σε διαγονιδιακά φυτά που απελευθέρωναν περίσσεια οπίνες, οι ψευδομονάδες που καταβολίζουν τις οπίνες συνυπήρχαν με άλλες ψευδομονάδες που χρησιμοποιούσαν διαφορετικές πηγές άνθρακα. Στην αγρίου τύπου ποικιλία οι δύο αυτοί μικροοργανισμοί θα έπρεπε κανονικά να ανταγωνίζονται για θρεπτικά συστατικά (Aruscavage et al., 2006). Οι Wilson και Lindow (1994) χρησιμοποίησαν σαλικυλικό οξύ ως μοναδική πηγή άνθρακα για ένα από τα στελέχη των ψευδομονάδων έτσι ώστε να μην ανταγωνίζεται με ένα γνωστό ανταγωνιστή και βρέθηκε παρόμοιος διατροφικός διαμερισμός μεταξύ των ειδών. Οι ερευνητές υπέθεσαν ότι θα μπορούσε να συμβεί συνύπαρξη μεταξύ επίφυτων μικροοργανισμών με διαφορετικά μοτίβα θρεπτικών πόρων. Εάν δύο ή περισσότεροι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν διαφορετικές πηγές άνθρακα, όλοι μπορούν να συμβιώσουν στην ίδια περιοχή της επιφάνειας του φυτικού ιστού. Η συμβίωση των περισσότερων μικροοργανισμών δεν χαρακτηρίζεται πλήρως ως συμβίωση (τα είδη μεταξύ τους δεν αναπτύσσονται το ίδιο σε αριθμό) ή ως ανταγωνισμός (τα είδη μεταξύ τους

μοιράζονται τα ίδια θρεπτικά στοιχεία) αλλά χαρακτηρίζεται ως μια συμβίωση μεταξύ των δύο άκρων. Είναι εμφανές ότι η εύρεση των θρεπτικών συστατικών που είναι διαθέσιμα και πως αυτά χρησιμοποιούνται από τα παθογόνα βακτήρια είναι απαραίτητη για το σχεδιασμό μιας στρατηγικής με σκοπό τον έλεγχο των ανθρώπινων παθογόνων βακτηρίων στη φυλλόσφαιρα με χρήση παραγόντων βιοελέγχου.

#### **1.4 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επίφυτων και των παθογόνων βακτηρίων**

Οι επιφάνειες των φυτών περιέχουν διάφορα είδη μικροοργανισμών. Όταν τα τροφιμογενή παθογόνα εισέρχονται στη φυλλόσφαιρα υπάρχουν αρκετές πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επίφυτων και των παθογόνων μικροοργανισμών. Σε περιπτώσεις όπου τα φρέσκα λαχανικά έχουν ενοχοποιηθεί για πρόκληση ασθένειας, είναι πιθανό να έχει υπάρξει συνεργασία μεταξύ επίφυτων και παθογόνων επειδή ο ανταγωνισμός μεταξύ συμβιωτικής επίφυτης μικροχλωρίδας και παροδικών παθογόνων θα ευνοούσε την εξάλειψη των τελευταίων (Aguscavage et al., 2006). Οι Wells και Butterfield (1997) αναφέρουν ότι η μόλυνση με βακτήρια του γένους *Salmonella* αυξήθηκε στα λαχανικά που είχαν βακτηριακή μαλακή σήψη σε σύγκριση με μη μολυσμένα προϊόντα. Αυτό συνεπάγεται ότι τα παθογόνα των φυτών είχαν μια συνεργιστική ή συμβιωτική σχέση με τη φυσική μικροχλωρίδα. Η γνώση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ανθρώπινων παθογόνων μικροοργανισμών και των παθογόνων των φυτών μπορεί να είναι ευεργετική στη μελέτη των τροφολοιμώξεων που σχετίζονται με φρέσκα και ελάχιστα μεταποιημένα λαχανικά, επειδή αυτή η αλληλεπίδραση συμβαίνει σε ένα δυσμενές περιβάλλον όπου η συνεργασία είναι αναγκαία για τον πολλαπλασιασμό τόσο των επίφυτων όσο και των παθογόνων μικροοργανισμών.

Οι επίφυτοι μικροοργανισμοί που μπορεί να είναι παθογόνοι μπορεί να συμβάλουν στη δημιουργία ενός περιβάλλοντος που καθιστά εύκολο τον πολλαπλασιασμό των άλλων παθογόνων μικροοργανισμών. Αυτές οι περιβαλλοντικές αλλαγές περιλαμβάνουν αλλαγές στην έκκριση ουσιών από το φυτό έτσι ώστε να αυξηθεί η συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών και η ενεργότητα νερού (Beattie et al., 1999). Εάν προκαλούνται μικροπεριβαλλοντικές αλλαγές από τη φυσική μικροχλωρίδα της επιφάνειας των φύλλων που επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό των εντερικών παθογόνων, υπάρχουν σημαντικές ανησυχίες για την ασφάλεια των τροφίμων. Ο μικροοργανισμός *Salmonella enterica* serovar Typhimurium που εμβολιάστηκε μαζί με βακτήρια που προκαλούν μαλακή σήψη στα λαχανικά είχε ένα λογάριθμο μεγαλύτερη αύξηση στο μέγεθος του πληθυσμού του σε

πατάτες, καρότα και πιπεριές σε σύγκριση με την περίπτωση που είχε εμβολιαστεί μόνος του. Αιτία αυτού του φαινομένου ήταν ότι τα βακτήρια που προκαλούν τη μαλακή σήψη κατέστρεψαν τα υγιή κύτταρα του ιστού και πολλαπλασιάστηκαν με θρεπτικά συστατικά που υπήρχαν στα διαρρηγμένα κύτταρα. Έτσι, απελευθερώνονται θρεπτικά συστατικά και νερό που μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τον παθογόνο μικροοργανισμό (Beuchat, 2002). Οι Wells και Butterfield (1997) έδειξαν μια συσχέτιση μεταξύ της βακτηριακής μαλακής σήψης και της συχνότητας εμφάνισης του ίδιου παθογόνου στη λιανική αγορά φρέσκων λαχανικών, όπου ο πλυθυσμός ήταν σχεδόν διπλάσιος στη περίπτωση που υπήρχε βακτηριακή μαλακή σήψη σε σύγκριση με τους υγιείς φυτικούς ιστούς.

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να τροποποιήσουν το pH του λαχανικού και να εκκρίνουν τοξικές ουσίες για τα λαχανικά, δίνοντας έτσι θρεπτικό πλεονέκτημα στους επίφυτους μικροοργανισμούς. Οι τοξίνες μεταβάλλουν το μικροπεριβάλλον προκαλώντας απελευθέρωση σακχάρων από τα φυτικά κύτταρα και παρέχοντας αντιμικροβιακή δράση. Τα περισσότερα παθογόνα χρησιμοποιούν ένζυμα για να αποικοδομήσουν τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος. Τα υποπροϊόντα αυτών των καταβολικών αντιδράσεων μπορούν να δημιουργήσουν νέες πηγές άνθρακα για τα παθογόνα ή τους επίφυτους μικροοργανισμούς στη φυλλόσφαιρα. Οι πηκτικές ουσίες του κυτταρικού τοιχώματος αποικοδομούνται από πηκτινολυτικά ένζυμα δίνοντας πολυγαλακτουρονικό οξύ, ραμνόζη, αραβινόζη, γαλακτόζη και μικρές ποσότητες άλλων μορίων με βάση τον άνθρακα. Πολλές από αυτές τις ενώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα βακτήρια ως πηγές άνθρακα και ενέργειας (Aguscavage et al., 2006).

Τα εντερικά παθογόνα μπορούν να προσαρμοστούν στη φυλλόσφαιρα έπειτα από επιμόλυνση αυτής με παθογόνους μικροοργανισμούς λόγω της εξασθένησης του φυτού. Ωστόσο, μερικά φυτά μπορούν να αντισταθούν στην εισβολή από εντερικά παθογόνα μέσω σαλικυλικό-ανεξάρτητων και σαλικυλικό-εξαρτώμενων μονοπατιών. Οι μικροοργανισμοί που είναι ικανοί να αποδυναμώσουν τους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών μπορούν να αλλάξουν το μικροπεριβάλλον με τρόπο που αυξάνουν τόσο τον πολλαπλασιασμό όσο και την επιμονή των εντερικών παθογόνων στη φυλλόσφαιρα, καθιστώντας την εξάλειψη τους με απολυμαντικά εξαιρετικά δύσκολη (Aguscavage et al., 2006).

Απαιτείται περισσότερη έρευνα για να καθοριστεί πως επηρεάζονται τα εντερικά παθογόνα από τον πολλαπλασιασμό άλλων παθογόνων μικροοργανισμών στα λαχανικά. Ανεξάρτητα από τη διατροφή και τον ανταγωνισμό, τα υπόλοιπα παθογόνα μπορούν να αποικίσουν μαζί με τα εντερικά παθογόνα και να τα προστατέψουν από την αφυδάτωση, την υπερϊώδη ακτινοβολία και το πλύσιμο. Αυτά τα παθογόνα μπορούν να εισέλθουν σε ειδικές



προστατευόμενες περιοχές, όπως είναι ο ενδοκυττάριος θάλαμος, και να μην επηρεάζονται από τις μεθόδους αποστείρωσης επηρεάζοντας έτσι την ασφάλεια του προϊόντος (Aruscavage et al., 2006).

## **1.5 Μηχανισμός της προσκόλλησης των βακτηρίων στα λαχανικά**

### **1.5.1 Ενδείξεις παθογόνων βακτηρίων στο εσωτερικό των λαχανικών**

Τα παθογόνα βακτήρια μπορούν να εισαχθούν εντός των φρέσκων προϊόντων σε πολλά διαφορετικά σημεία κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας και της διανομής. Οι περισσότερες μελέτες έχουν εξετάσει τους τρόπους της ενδεχόμενης επιμόλυνσης πριν από τη συγκομιδή και την επακόλουθη εισχώρηση (internalization) των μικροοργανισμών εντός του φυτού. Οι εργασίες αυτές που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα έχουν εξετάσει πολλούς διαφορετικούς συνδυασμούς φυτικών ειδών και στελεχών βακτηρίων που επηρεάζουν την εισχώρηση. Η εισχώρηση αυτή των εντερικών παθογόνων *Salmonella* spp. και *E. coli* O157:H7 έχει μελετηθεί τόσο φρούτα όσο και φυλλώδη λαχανικά. Παρόλο που οι μικροοργανισμοί *Salmonella* spp. και *E. coli* O157:H7 έχουν βρεθεί να εισέρχονται σε πολλά διαφορετικά φυτά, έχουν αναφερθεί διαφορές στη βιβλιογραφία ακόμα και όταν έχει χρησιμοποιηθεί το ίδιο φυτό, το ίδιο βακτήριο και η ίδια διαδρομή επιμόλυνσης. Από αυτά τα δεδομένα καθίσταται σαφές ότι υπάρχει μια σειρά από παράγοντες που επηρεάζουν την πιθανότητα εισχώρησης ενός παθογόνου βακτηρίου εντός ενός φυτού. Τέτοιοι είναι το είδος του φυτού, το στέλεχος ή/και ο ορότυπος του βακτηρίου, ο τρόπος μόλυνσης και η ηλικία του φυτού (Deering et al., 2012).

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, τα βακτήρια εισέρχονται στο φυτό μέσω φυσικών ανοιγμάτων (στομάτια και φακίδια) ή/και μέσω περιοχών που έχουν υποστεί φυσική ή βιολογική καταπόνηση. Πρόσφατα έχει αποδειχτεί ότι η επιλεκτική αντίχνευση των *E. coli* και *Salmonella* spp. κοντά στα στομάτια μπορεί να είναι το αποτέλεσμα μιας χημειοτροπικής αλληλεπίδρασης (Deering et al., 2012).

Η διαγραφή ορισμένων γονιδίων του εκκριτικού συστήματος τύπου III (TTSS) είχε ως αποτέλεσμα να αδυνατεί το βακτήριο να προσκολληθεί στην επιφάνεια του φυτού, ενώ η διαγραφή άλλων συστατικών επέτρεπε την προσκόλληση αλλά περιόριζε τη συγκέντρωση των βακτηρίων γύρω από τα στομάτια. Η αντίχνευση της *Salmonella* spp. στην περιοχή των στοματίων έχει αποδειχθεί ότι εξαρτάται από την κινητικότητα των βακτηρίων καθώς και

από την ηλιακή ακτινοβολία που δέχεται ο ιστός του φύλλου η οποία επηρεάζει το άνοιγμα των στοματίων. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στην είσοδο των μικροοργανισμών εντός του φυτού διαδραματίζει η φωτοσύνθεση αναφορικά με την χημειοτακτική αντίδραση και η απουσία γενετικής διαταραχής στα στομάτια (Deering et al., 2012).

Ενώ τα παραπάνω στοιχεία δείχνουν έντονα ότι η είσοδος των βακτηρίων εντός του φυτικού ιστού μέσω ανοικτών στοματίων είναι μια ενεργητική διαδικασία που απαιτεί ζωντανό φυτικό ιστό και βακτηριακά κύτταρα, είναι επίσης πιθανό ότι τα βακτήρια εισχωρούν παθητικά μέσω μολυσμένου νερού που δέχονται τα φυτά από το περιβάλλον. Μελέτες με τους μικροοργανισμούς *Salmonella* spp. και *E. coli* O157:H7 έχουν δείξει ότι τα βακτήρια αυτά μπορούν να ανακτώνται από σπορόφυτα, από μίσχους ή/και από φύλλα μετά την έκθεση των σπόρων σε μολυσμένο νερό (Howard et al., 2003; Warriner et al., 2003). Επιπλέον, τα βακτήρια μπορούν να ανακτηθούν από τα υπέργεια τμήματα του φυτού έπειτα από έκθεση των ριζών σε νερό που περιέχει το παθογόνο, υποδεικνύοντας την πιθανότητα ότι τα βακτήρια μπορούν μέσω της ρίζας να εισχωρήσουν μέσα στο φυτό (Bernstein et al. 2007; Franz et al., 2007). Από όλες τις μελέτες διαφαίνεται ότι τα βακτήρια μπορούν να εισέλθουν στο φυτό παθητικά και να μεταφερθούν μέσα σε αυτό μέσω της ροής του νερού. Αυτό αποδείχτηκε σε μία μελέτη (Solomon και Matthews, 2005) όπου εξετάστηκε η εισχώρηση και η κίνηση μικροσφαιριδίων φθορισμού μέσω επιφανειακής άρδευσης. Συγκεκριμένα, τα σφαιρίδια πολυστυρενίου που είχαν μέγεθος βακτηρίου, παρελήφθησαν από το έδαφος και βρέθηκαν στο υπέργειο τμήμα του φυτού υποδεικνύοντας ότι αυτός ο βαθμός εισχώρησης και διακίνησης των βακτηρίων δεν απαιτεί καμία ενεργή βιολογική διαδικασία από την πλευρά των βακτηρίων (Deering et al., 2012).

### **1.5.2 Επιβίωση εντός του φυτικού ιστού**

Η επιβίωση των βακτηρίων εντός του φυτικού ιστού είναι αποτέλεσμα της προσαρμογής του σε αυτό το άγνωστο περιβάλλον. Η προσαρμογή αυτή είναι αποτέλεσμα έκφρασης διαφόρων γονιδίων που μπορεί να βρίσκονται σε πλασμίδια ή στο χρωμόσωμα ή σαν μεγάλες ενότητες που αποτελούνται από πληθώρα γονιδίων και οπερονίων. Μια τέτοια συστάδα γονιδίων αποτελούν και οι νησίδες παθογένειας, η έκφραση των οποίων γενικά εκδηλώνεται μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της μόλυνσης (Marcus et al., 2000). Τα τελευταία 20 χρόνια, έχει βρεθεί ότι πολλά παθογόνα των φυτών και των ζώων μοιράζονται ένα κοινό μοριακό μηχανισμό για να επιτεθούν στον ξενιστή τους: το εκκριτικό σύστημα

τύπου III (TTSS), το οποίο χρησιμοποιούν για να εισαγάγουν πρωτεΐνες τελεστές (effector proteins) στο κύτταρο ξενιστή. Η ικανότητα του TTSS να μεταφέρει τις πρωτεΐνες τελεστές στο εσωτερικό του κυττάρου του ευκαρυωτικού ξενιστή επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου των διαφορών μεταξύ των βελονοειδών εξαρτημάτων των ζωικών παθογόνων (needles) και των τριχοειδών εξαρτημάτων των φυτοπαθογόνων (pili). Τα βελονοειδή εξαρτήματα που βρίσκονται στην επιφάνεια των ζωικών παθογόνων είναι πολύ μικρότερα από τα αντίστοιχα των φυτοπαθογόνων και θεωρούνται πολύ μικρά για την άμεση μετατόπιση των πρωτεϊνών τελεστών στο φυτικό κύτταρο μέσω του κυτταρικού τοιχώματος (Deering et al., 2012). Έχει αποδειχθεί ότι τα *E. coli* και *Salmonella* spp. παράγουν νηματοειδείς δομές κατάλληλης διαμέτρου που συμμετέχουν στη μετατόπιση πρωτεϊνών που επεκτείνουν σημαντικά το μήκος της «ακίδας» (Yip et al., 2006). Γνωστές είναι επίσης οι μεταλλάξεις που αυξάνουν το μήκος του βελονοειδούς εξαρτήματος, αν και αυτές τυπικά μειώνουν την ποσότητα των πρωτεϊνών τελεστών που εκκρίνονται.

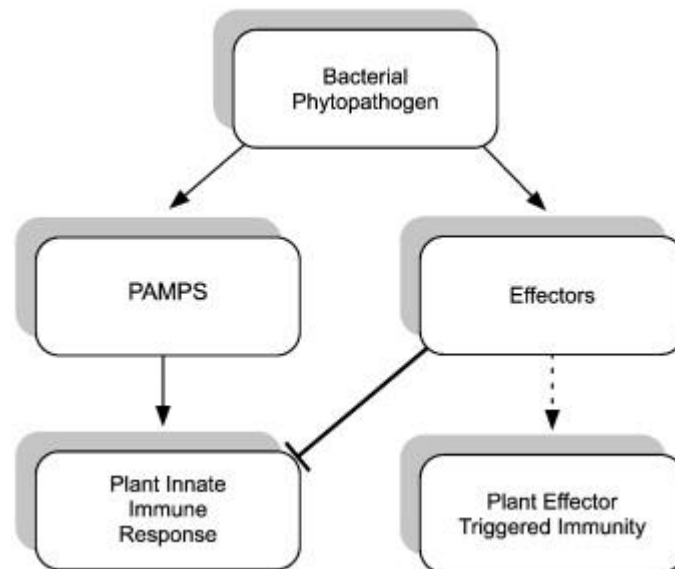
Οι πρωτεΐνες τελεστές μπορούν να παίξουν πολλούς ρόλους στην παθογένεια, από την τροποποίηση του κυτταρικού μεταβολισμού μέχρι και τη μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης. Επιπλέον, ανάλυση του γονιδιώματος των φυτικών και των ζωικών παθογόνων κατέστησε σαφές ότι πολλά γονίδια τελεστές βρίσκονται στις περιοχές παθογένειας που μπορούν να προσαρμόζονται καλά για τη μετακίνηση από το ένα είδος στο άλλο μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (Kado et al., 2009; Lovell et al., 2009; Tobe et al., 2006). Αυτό είναι σε συμφωνία με εργασία που έχει πραγματοποιηθεί σε συστήματα ζωικών και φυτικών παθογόνων που υποδεικνύει ότι τα παθογόνα βακτήρια είναι ικανά να προσαρμοστούν και να επιβιώσουν σε ένα ευρύ φάσμα ξενιστών (Preston, 2007). Απαιτείται περισσότερη έρευνα για να εξεταστεί το ζήτημα του κατά πόσο ή όχι τα εντερικά παθογόνα έχουν αποκτήσει ή βρίσκονται στη διαδικασία να αποκτήσουν γονίδια για παραγωγή νέων πρωτεϊνών τελεστών από τα φυτοπαθογόνα βακτήρια (Deering et al., 2012).

Ένας αριθμός από μελέτες έχουν δείξει ότι τα παθογόνα *Salmonella* spp. και *E. coli* είναι σε θέση να αυξάνουν τον πληθυσμό τους ακόμα και σε υψηλά επίπεδα είτε στην επιφάνεια είτε στο εσωτερικό του φυτικού ιστού. Αυτό σημαίνει ότι αυτά τα παθογόνα βακτήρια είναι ικανά να αξιοποιήσουν τα θρεπτικά συστατικά του φυτού με πολλούς μηχανισμούς. Επίσης, τα βακτήρια που διαβιώνουν στον αποπλασματικό χώρο του φυτού πιθανώς είναι σε θέση να χρησιμοποιήσουν άμεσα τους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος. Για να επιτευχθεί όμως αυτό απαιτούνται ένζυμα που διασπούν αυτά τα μακρομόρια στα επιμέρους σάκχαρα (Deering et al., 2012). Στον μικροοργανισμό *Salmonella* spp. έχει ταυτοποιηθεί τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικοποιεί ένα τέτοιο ένζυμο (Yoo et al., 2004). Σύμφωνα με μια άλλη

θεωρία, τα παθογόνα βακτήρια εξαρτώνται από την παρουσία άλλων βακτηρίων ή μυκήτων που μπορούν να αποικοδομήσουν τα πολυμερή του κυτταρικού τοιχώματος παρέχοντας έτσι έμμεσα πηγές άνθρακα και ενέργειας.

### 1.5.3 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παθογόνων βακτηρίων και των ξενιστών

Οι αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των φυτοπαθογόνων και των ξενιστών που καθορίζουν εάν η προσβολή είναι επιτυχής χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες (Σχήμα 1).



**Σχήμα 1** Σχηματική απεικόνιση της απόκρισης των φυτών ενάντια των παθογόνων βακτηρίων (Deering et al., 2012)

1. Ενεργοποίηση της εγγενούς ανοσοαπόκρισης του φυτού από κοινά συστατικά που εντοπίζονται στην επιφάνεια του παθογόνου μικροοργανισμού (PAMPS)

Οι φυτικοί ξενιστές έχουν αναπτύξει μια πληθώρα υποδοχέων που είναι σχεδιασμένοι να αναγνωρίζουν κοινά συστατικά της επιφάνειας των βακτηρίων ώστε να ενεργοποιήσουν την άμυνα του φυτού για να περιοριστεί η ανάπτυξη και η εξάπλωση του παθογόνου βακτηρίου.

Πολλά από αυτά τα PAMPS (φλαγκελλίνη, πεπτιδογλυκάνη, λιποπολυσακχαρίτες κ.λπ.) συνδέονται όχι μόνο με φυτοπαθογόνα αλλά και με πολλούς άλλους διαφορετικούς τύπους μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί *Salmonella spp.* και *E. coli* περιέχουν μια σειρά από PAMPS που μάλλον είναι αναγνωρίσιμα από την έμφυτη ανοσοαπόκριση του φυτού και σε ορισμένες τουλάχιστον περιπτώσεις η εξάλειψη αυτών των PAMPS οδηγεί σε καλύτερη ανάπτυξη των παθογόνων στο φυτικό περιβάλλον. Έχει βρεθεί ότι στο *Arabidopsis thaliana* η παρουσία του *Salmonella Typhimurium* ενεργοποίησε την έμφυτη ανοσολογική απόκριση και η εξάλειψη της οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των βακτηρίων εντός του φυτού (Schikora et al., 2008).

## 2. Χρήση πρωτεϊνών τελεστών για καταστολή της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης (effector triggered suppression, ETS)

Στα γονιδιώματα των φυτοπαθογόνων υπάρχουν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες τελεστές που εισάγονται μέσω του TTSS στα κύτταρα ξενιστές και αλληλεπιδρούν στις διαδικασίες επικοινωνίας που επάγονται από την παρουσία PAMPS, καταστέλλοντας έτσι την έμφυτη ανοσολογική απόκριση του φυτού. Κατά πόσο τα ανθρώπινα παθογόνα βακτήρια μεταφέρουν τελεστές που μπορούν να καταστείλουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις των φυτών θα πρέπει να εξεταστεί περισσότερο, αν και η δυνατότητα απόκτησης αυτών των τελεστών με οριζόντια μεταφορά γονιδίων από φυτοπαθογόνα βακτήρια θα παραμένει ως πιθανότητα σε κάθε περίπτωση.

## 3. Η ανίχνευση βακτηριακών πρωτεϊνών τελεστών από τον ξενιστή έχει σχεδιαστεί να προστατεύει τα συστήματα που ανατρέπονται από τους ETS

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών τελεστών του παθογόνου από το αμυντικό σύστημα του ξενιστή αναφέρεται σήμερα συνήθως ως ETI (effector triggered immunity) και ιστορικά περιγράφεται ως η αλληλεπίδραση μεταξύ γονιδίων αμολυσματικότητας (AVR) που έχουν τα παθογόνα που ανιχνεύτηκαν από τα γονίδια ανθεκτικότητας (R) που έχουν τα φυτά. Η ειδίκευση αυτής της αλληλεπίδρασης οδηγεί σε εκδήλωση συμβατότητας ή ασυμβατότητας που εξαρτάται από το στέλεχος του παθογόνου και την ποικιλία του ξενιστή. Ενώ δεν υπάρχει άμεση απόδειξη ότι μεταξύ των παθογόνων βακτηρίων και των φυτών ξενιστών υπάρχει αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ AVR-R γονιδίων, υπάρχουν αποδείξεις ότι διαφορετικά βακτηριακά στελέχη αποκρίζουν διαφορετικές ποικιλίες του ίδιου είδους με

ποικίλα ποσοστά και τρόπους. Αυτό υποδηλώνει ότι ο ΕΤΙ μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο όσον αφορά τον επιτυχημένο ή μη αποικισμό των ανθρώπινων παθογόνων στα φυτά. Περαιτέρω έρευνα μπορεί να συντελέσει στη δημιουργία αποικιών με αυξημένη αντοχή ενάντια στον αποικισμό παθογόνων βακτηρίων.

## **1.6 Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Salmonella* spp.**

Η εμπλοκή των βακτηρίων *Salmonella* spp. στις τροφικές δηλητηριάσεις περιγράφηκε πρώτη φορά το 1985 όπου ο μικροοργανισμός που αρχικά χαρακτηρίστηκε ως *Bacillus cholerae-suis*, απομονώθηκε από τον κτηνίατρο D.E. Salmon από γουρούνια που υπέφεραν από χολέρα. Άλλοι παρόμοιοι μικροοργανισμοί απομονώθηκαν από τροφιμογενείς λοιμώξεις και από μολυσμένα ζώα.

Τα επιδημιολογικά στοιχεία υποδεικνύουν πως ο μικροοργανισμός *Salmonella* spp. είναι η κύρια αιτία πρόκλησης ασθενειών σε ανθρώπους από τροφιμογενή βακτήρια. Είναι αξιοσημείωτο ότι το πρόβλημα της σαλμονέλλωσης στον άνθρωπο λόγω κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων αυξάνεται παγκοσμίως. Ο μεγάλος αριθμός κρουσμάτων τροφιμογενούς σαλμονέλλωσης τις λίγες τελευταίες δεκαετίες αποτελεί αντικείμενο ενδιαφέροντος, διότι υπογραμμίζει το πλήθος των τροφίμων και των οροτύπων της *Salmonella*, τα οποία εμπλέκονται σε ανθρώπινες ασθένειες (Cox, 1999).

Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, τα ετήσια ποσοστά σαλμονέλλωσης είναι υψηλά με καταγεγραμμένες 20 εκατομμύρια περιπτώσεις από τις οποίες 500 κατέληξαν σε θάνατο (Kunze et al., 2008). Η σαλμονέλλωση έχει συσχετιστεί κυρίως με την κατανάλωση πουλερικών. Ωστόσο, αρκετά και διαφορετικά είδη που ανήκουν στο γένος *Salmonella* έχουν ανιχνευτεί σε διάφορα λαχανικά (Wells and Butterfield, 1997). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, η σαλμονέλλωση ήταν η δεύτερη πιο συχνή ζωνοσογόνος λοίμωξη το 2009, με 108.614 επιβεβαιωμένα κρούσματα και ένα ποσοστό θνησιμότητας 0,08%, το οποίο αντιστοιχεί περίπου σε 90 θανάτους ανθρώπων (EFSA-ECDC, 2011). Εκτεταμένα κρούσματα σαλμονέλλωσης έχουν αποδοθεί σε βλαστούς φασολιών, σέλινου, μαρουλιού, λάχανου και αντιδιών (Beuchat, 1996). Η πιο πρόσφατη επιδημία έλαβε χώρα στα τέλη του 2010 όπου 140 κρούσματα καταγράφηκαν σε 26 πολιτείες της Αμερικής τα οποία συσχετίστηκαν με κατανάλωση πικάντικων λαχανικών (Olaimat et al., 2012).

### 1.6.1 Χαρακτηριστικά του γένους *Salmonella*

Το γένος *Salmonella* είναι προαιρετικά αναερόβιο, Gram αρνητικό ραβδόμορφο βακτήριο και ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae της οποίας οικογένειας τα μέλη διαφοροποιούνται με οροτυπικές μεθόδους. Έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 2200 ορότυποι όμως λίγοι από αυτούς προκαλούν τροφοδηλητηριάσεις στον άνθρωπο. Παρόλο που τα μέλη του γένους μπορούν να κινούνται με τη βοήθεια περίτριχων μαστιγίων, υπάρχουν και παραλλαγές χωρίς μαστίγια, όπως τα *S. enterica* ορότυποι Pullorum και Gallinarum, καθώς και στελέχη χωρίς ικανότητα κίνησης. Τα βακτήρια του γένους *Salmonella* είναι αρνητικά στην οξειδάση και θετικά στην καταλάση. Το μέγεθος τους κυμαίνεται από 0,7-1,5x2,5μm, αν και μερικές φορές μπορεί να αναπτυχθούν μακρά νήματα. Τα περισσότερα στελέχη ζυμώνουν τη γλυκόζη με την παραγωγή αερίου και οξέος (Cox, 1999).

Οι κυριότεροι ορότυποι της σαλμονέλλας που προκαλούν τροφικές δηλητηριάσεις είναι: *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, *S. Derby*, *S. Anatum* και *S. Infantis* (Robinson, 1993).

### 1.6.2 Ταξινόμηση και Ονοματολογία

Σύμφωνα με το Κέντρο Συνεργασίας του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization – WHO) για την Αναφορά και την Έρευνα στη *Salmonella*, για τα είδη *S. enterica* και *S. bongori* αυτή τη στιγμή έχουν ταυτοποιηθεί 2.443 και 20 ορότυποι αντίστοιχα. Τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών έχουν υιοθετήσει ως επίσημη ονομασία τους το παρακάτω σχήμα, όπου το γένος *Salmonella* περιλαμβάνει δύο είδη, κάθε ένα από τα οποία περιλαμβάνει διάφορους ορότυπους. (Πίνακας 1.3). Τα δύο είδη είναι το *S. enterica* και το *S. bongori*, με το *S. enterica* να διαιρείται σε έξι υποείδη, τα οποία αναφέρονται με ένα λατινικό νούμερο και ένα όνομα (I: *S. enterica* subsp. *enterica*, II: *S. enterica* subsp. *salamae*, IIIa: *S. enterica* subsp. *arizonae*, IIIb: *S. enterica* subsp. *diarizonae*, IV: *S. enterica* subsp. *houtenae* και VI: *S. enterica* subsp. *indica*). Τα υποείδη του *S. enterica* διαφοροποιούνται βιοχημικά και μέσω χρωμοσωμικής συγγένειας. Στους ορότυπους του γένους *Salmonella* που έχουν συνδεθεί με πρόσφατες περιπτώσεις τροφογενούς ασθένειας συμπεριλαμβάνονται οι Enteritidis, Typhimurium, Newport και Stanley του *S. enterica* (Brenner et al., 2000).

**Πίνακας 1.3** Τα είδη, υποείδη και ορότυποι του γένους *Salmonella* (Brenner et al., 2000)

<b>Είδη και υποείδη <i>Salmonella</i></b>	<b>Αριθμός οροτύπων</b>
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1.454
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	489
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	94
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	324
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	70
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	12
<i>S. bongori</i> (V)	20
<b>Σύνολο</b>	<b>2.463</b>

### **1.6.3 Τρόφιμα που συνδέονται με σαλμονέλλωση**

Τα είδη *Salmonella* αποτελούν ένα σημαντικό παθογόνο παράγοντα για την τροφική αλυσίδα για διάφορους λόγους, όπως είναι η παρουσία τους στο περιβάλλον, η εντατικοποίηση των κτηνοτροφικών πρακτικών στις βιομηχανίες κρέατος και ψαριών οι οποίες προωθούν την εξάπλωση του μικροβίου μεταξύ των ζώων και η ανακύκλωση των υποπροϊόντων σε ζωοτροφές. Σε πολλές χώρες οι κύριες πηγές *Salmonella* spp. αποτελούν τα αυγά και το κρέας πουλερικών. Τα συνεχιζόμενα κρούσματα από τον ορότυπο Enteritidis που συνδέονται με την κατανάλωση ωμών ή ελαφρώς βρασμένων αυγών ή προϊόντων που περιέχουν αυγά, τονίζει περισσότερο τη σημασία των πουλερικών ως πηγή για την ανθρώπινη σαλμονέλλωση. Καθίσταται έτσι επείγουσα η ανάγκη για συνεχή και αυστηρό έλεγχο των πτηνοτροφικών πρακτικών. Παρόμοιες συνθήκες επικρατούν και στις βιομηχανίες υδατοκαλλιέργειας (Cox, 1999).

Τα τελευταία χρόνια όμως και τα φρούτα και τα λαχανικά έχουν κατηγορηθεί ότι αποτελούν πηγή σαλμονέλλωσης του ανθρώπου. Η κατάσταση αυτή έχει προκύψει από την αυξημένη παγκόσμια εξαγωγή φρέσκων και αφυδατωμένων φρούτων και λαχανικών από χώρες στις οποίες επικρατούν τροπικά και υποτροπικά κλίματα. Οι συνθήκες που επικρατούν κατά την παραγωγή, συλλογή και διανομή των προϊόντων σε αυτές τις χώρες δεν πληρούν πάντα τους ορθούς κανόνες υγιεινής και συντελούν στη μόλυνση του προϊόντος (Cox, 1999).



Κατά συνέπεια το βακτήριο *Salmonella* μπορεί να εισέλθει σε οποιοδήποτε σημείο στην τροφική αλυσίδα από τις ζωοτροφές, την παραγωγή τροφίμων, την επεξεργασία και το λιανικό εμπόριο καθώς και στους χώρους εστίασης ή στην οικιακή προετοιμασία του φαγητού. (Pui et al., 2011). Οι κύριες ομάδες τροφίμων που σχετίζονται με σαλμονέλωση παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.4.

**Πίνακας 1.4** Παραδείγματα καταγεγραμμένων κρουσμάτων σαλμονέλωσης (Pui et al., 2011)

Έτος	Χώρα	Τρόφιμο	Ορότυπος	Αριθμός περιστατικών	Αναφορά
2010	Η.Π.Α	Κόκκινες πιπεριές	Montevideo	272	CDC, 2010
		Πούλπα φρουτοχυμού	Typhi	9	
		Αυγά	Enteritidis	2.752	
2009	Η.Π.Α	Μηδική	Saintpaul	235	CDC, 2010
2008	Η.Π.Α	Δημητριακά	Agona	28	CDC, 2010
2007	Η.Π.Α	Ζωοτροφή	Schwarzengrund	62	CDC, 2010
2006	Η.Π.Α	Φυστικοβούτυρο	Tennessee	>288	Montville and Matthews, 2008
2005	Αυστρία	Μίγμα σαλάτας	Enteritidis PT21	85	D'Aoust and Maurer, 2007
	Αγγλία	Κεμπάπ		195	
	Ολλανδία	Νωπός κιμάς	Typhimurium PT104	165	
2004	Κίνα	Αυγό	Enteritidis	197	D'Aoust and Maurer, 2007
	Μ. Βρετανία	Μαρούλι	Newport	>350	Montville and Matthews, 2008
2003	Γερμανία	Τσάι	Agona	42	D'Aoust and Maurer, 2007
2001	Καναδάς, Αυστραλία	Φιστίκια	Stanley	93	D'Aoust and Maurer, 2007
2001	Νορβηγία, Σουηδία	Ψάρι	Livingstone	60	D'Aoust and Maurer, 2007
2000	Σιγκαπούρη	Γαύρος	Typhimurium DT 104L	33	Ling et al., 2002
1999	Ιαπωνία	Καλαμάρι	<i>Salmonella</i> spp.	<453	Montville and Matthews, 2008
1996	Γαλλία	Τυρί	<i>Salmonella</i> spp.	14	Colak et al., 2007
1994	Ελβετία	Πατατοσαλάτα	Typhi	10	Gruner et al., 1997

#### 1.6.4 Χαρακτηριστικά της σαλμονέλλωσης

Μολύνσεις του ανθρώπου από *Salmonella* μπορούν να οδηγήσουν σε διάφορες κλινικές καταστάσεις όπως ο τυφοειδής πυρετός, η απλή εντεροκολίτιδα και οι συστηματικές μολύνσεις από μη τυφοειδείς μικροοργανισμούς. Ο εντερικός πυρετός είναι μια σοβαρή ανθρώπινη ασθένεια που συνδέεται με τυφοειδή και παρατυφοειδή στελέχη. Τα συμπτώματα του εντερικού πυρετού εμφανίζονται έπειτα από μια περίοδο επώασης που κυμαίνεται από 7 έως 28 ημέρες και μπορεί να συμπεριλαμβάνουν διάρροια, παρατεταμένο και οξύ πυρετό, κοιλιακό πόνο, πονοκέφαλο και πλήρη σωματική εξάντληση. Η διάγνωση της ασθένειας εξαρτάται από την απομόνωση του μολυσματικού παράγοντα από δείγματα αίματος και ούρων κατά τα πρώτα στάδια της ασθένειας ή από κόπρανα μετά από την εκδήλωση των κλινικών συμπτωμάτων. Μια χωρίς συμπτώματα κατάσταση χρόνιου φορέα συνήθως ακολουθεί την έντονη φάση του εντερικού πυρετού (Pui et al., 2011).

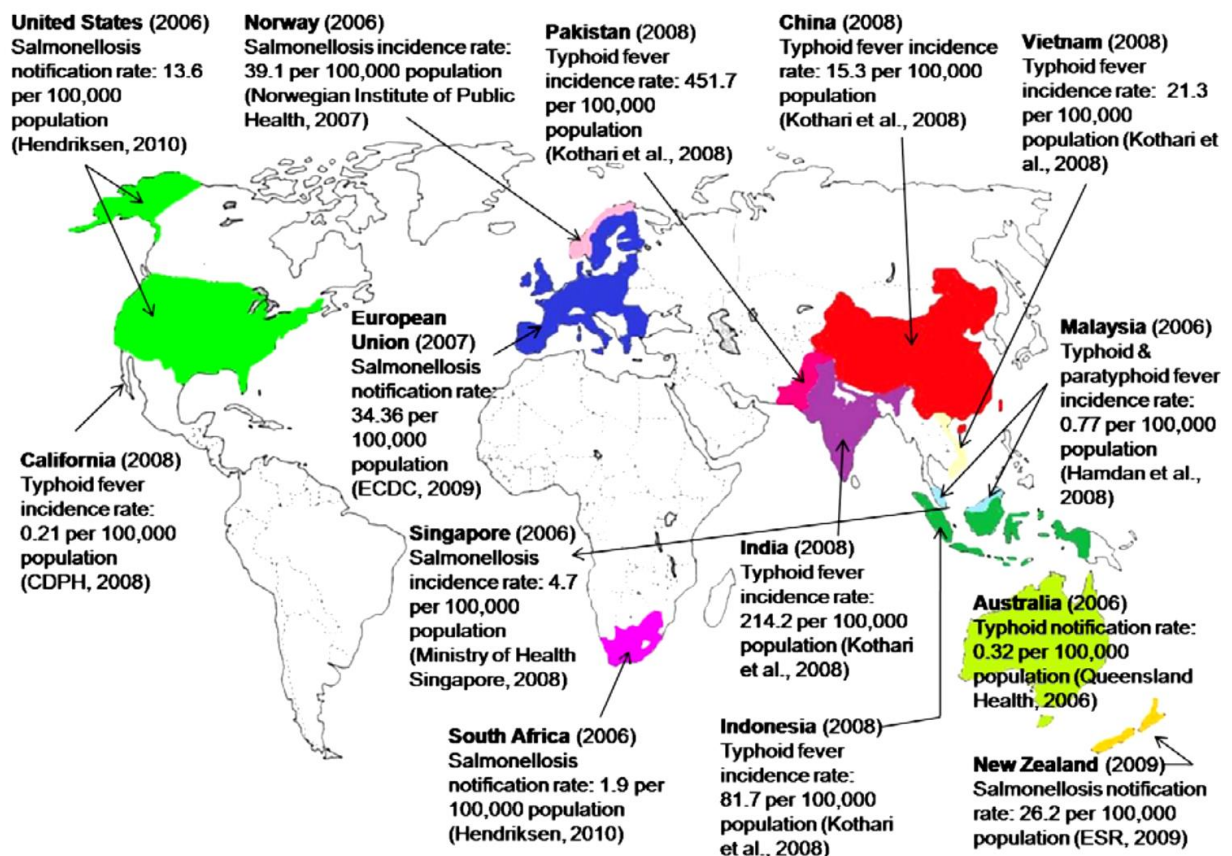
Οι ανθρώπινες μολύνσεις από μη τυφοειδή στελέχη *Salmonella* συχνά οδηγούν σε εμφάνιση συμπτωμάτων 8 έως 72 ώρες έπειτα από την είσοδο του παθογόνου στον οργανισμό. Η ασθένεια συνήθως είναι αυτοπεριοριζόμενη και τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της αναίμακτης διάρροιας και του κοιλιακού πόνου υποχωρούν μέσα σε 5 μέρες από την αρχική εκδήλωση των συμπτωμάτων. Η επιτυχής θεραπεία των απλών αυτών περιστατικών μπορεί να απαιτεί μόνο υποστηρικτική θεραπεία όπως η αντικατάσταση των ηλεκτρολυτών που έχουν χαθεί. Σε τέτοιες περιπτώσεις δεν ακολουθείται αγωγή με αντιβιοτικά. Η τυχόν ασυμπτωματική παραμονή του βακτηρίου *Salmonella* στο έντερο οφείλεται πιθανώς στην καταστολή της εντερικής μικροχλωρίδας λόγω χρήσης των αντιβιοτικών. Οι ανθρώπινες μολύνσεις από μη τυφοειδή στελέχη μπορούν ωστόσο να επιδεινωθούν και να μετατραπούν σε συστηματικές μολύνσεις προκαλώντας χρόνια συμπτώματα (Cox, 1999).

Το βακτήριο *Salmonella* μπορεί να προκαλέσει χρόνιες καταστάσεις, όπως η ασηπτική αρθρίτιδα, το σύνδρομο Reiter και η αγκυλωτική σπονδυλίτιδα. Η εκδήλωση τέτοιων χρόνιων ασθενειών προϋποθέτει ικανότητα του βακτηριακού στελέχους να μολύνει βλενώδεις επιφάνειες (βλεννογόνους), παρουσία των λιποπολυσακχαριτών (LPS) της εξωτερικής μεμβράνης και ικανότητα να εισβάλλει σε κύτταρα ξενιστές (Pui et al., 2011).

### 1.6.5 Επιδημιολογικά στοιχεία σαλμονέλωσης

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση οι ορότυποι *Salmonella* Enteritidis και *S. Typhimurium* αναφέρονται ως οι δύο κύριοι αιτιολογικοί παράγοντες της σαλμονέλωσης στον άνθρωπο σύμφωνα με το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων. Το ίδιο συμβαίνει και στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, ενώ στην Αυστραλία η κατανομή των οροτύπων του παθογόνου *Salmonella* ποικίλλει γεωγραφικά. Έτσι, ενώ το *S. Typhimurium* ήταν ο πιο συχνός ορότυπος το 2008, το *S. Enteritidis* είχε συχνά αναφερθεί ως αιτία μολύνσεων του ανθρώπου παρόλο που δεν είναι ενδημικό στην Αυστραλία. Το *S. Enteritidis* είναι κυρίως εμπλεκόμενο με την κατανάλωση αυγών και πουλερικών ενώ το *S. Typhimurium* συνδέεται με ζώα που παράγουν προϊόντα όπως τα πουλερικά, οι χοίροι και τα πρόβατα. Η παγκόσμια διανομή των τροφίμων και η συνεχής μετακίνηση των ανθρώπων σε όλο τον κόσμο διευκολύνουν την εξάπλωση αυτού του παράγοντα που επιτρέπει την εμφάνιση νέων οροτύπων σαλμονέλας στις χώρες που εισάγονται.

Οι τυφοειδείς περιπτώσεις είναι σταθερά σε χαμηλούς αριθμούς στις ανεπτυγμένες χώρες αλλά η μη-τυφοειδής σαλμονέλωση έχει αυξηθεί σε όλο τον κόσμο. Ο τυφοειδής πυρετός προκαλεί συνήθως θνησιμότητα από 5 έως 30% των μολυσμένων ατόμων στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας εκτιμά ότι 16 με 17 εκατομμύρια περιπτώσεις εμφανίζονται ετησίως με αποτέλεσμα περίπου 600.000 θανάτους. Από την άλλη πλευρά οι μη-τυφοειδείς περιπτώσεις ανέρχονται σε 1,3 δισεκατομμύρια κρούσματα με 3 εκατομμύρια θανάτους. Στις Η.Π.Α προκύπτουν περίπου 2 έως 4 εκατομμύρια κρούσματα γαστρεντερίτιδας από *Salmonella* με περίπου 500 θανάτους ανά έτος. Στοιχεία για χώρες της Ασίας, της Αφρικής και της Νότιας και Κεντρικής Αμερικής είναι σπάνια γιατί αναφέρονται μόνο το 1 έως 10% των περιπτώσεων (Hanes, 2003; Hu et al., 2003). Σύμφωνα με τα τελευταία δημοσιευμένα δεδομένα, στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης το 2009 ήταν 23,6 κρούσματα ανά 100.000 κατοίκους.



Εικόνα 1.2 Περιπτώσεις σαλμονέλλωσης και εντερικού πυρετού σε διαφορετικές περιοχές του κόσμου (Pui et al., 2011)

## 1.7 Η ρόκα

Η ρόκα είναι γνωστή από τους αρχαίους χρόνους και αναφέρεται στη Βοτανική του Διοσκουρίδη (Material Medica), η συγγραφή της οποίας έγινε τον 1<sup>ο</sup> αιώνα μ.Χ. Με το όνομα «ρόκα» είναι γνωστά αρκετά είδη της οικογένειας *Brassicaceae*. Στην περιοχή της Μεσογείου χρησιμοποιούνται κυρίως 3 είδη: το ετήσιο είδος *Eruca sativa* Mill. που καλλιεργείται ευρέως καθώς και τα είδη *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC και *Diplotaxis muralis* (L.) DC που είναι κυρίως αυτοφυή φυτά και καλλιεργούνται σε περιορισμένη κλίμακα.

Στις Μεσογειακές χώρες το είδος *Eruca sativa* Mill. είναι ένα πολύ δημοφιλές λαχανικό. Τα τελευταία χρόνια η ζήτηση για ρόκα συνεχώς αυξάνεται ενώ σε ορισμένες χώρες θεωρείται εκλεκτό προϊόν. Ένας από τους λόγους που καθιστά όλο και περισσότερο δημοφιλή τη ρόκα στους καταναλωτές είναι η υψηλή περιεκτικότητά της σε γλυκοσινολικά

οξέα (glucosinolates –GLSs). Πρόσφατες έρευνες έχουν αποδείξει τη σημαντική περιεκτικότητα των ειδών της οικογένειας *Brassicaceae* σε θειογλυκοζίτες καθώς και την ευεργετική επίδραση στην υγεία του ανθρώπου (Fahey et al., 1999; Fahey et al., 2001; Holst et al., 2004; Keck et al., 2004). Τα γλυκοσινολικά οξέα υδρολύονται με το ένζυμο μυροσινάση, που υπάρχει στα φυτά που τις περιέχουν, με αποτέλεσμα την παραγωγή διάφορων ουσιών μεταξύ των οποίων και ισοθειοκυανούχες ενώσεις (isothiocyanates). Πιστεύεται ότι οι ισοθειοκυανούχες ενώσεις είναι υπεύθυνες για την προστατευτική δράση των *Brassicaceae* στην υγεία του ανθρώπου, με την ουσία σουλφοραφάνη που βρέθηκε και στη ρόκα, να αποτελεί μια από τις περισσότερο υποσχόμενες αντικαρκινικές φυσικές ουσίες (Holst et al., 2004; Keck et al., 2004).

Η εμπορία και διακίνηση της ρόκας, γίνεται είτε με τη μορφή δέματος των φύλλων όπως έχουν κοπεί από τον παραγωγό είτε ως νωπά τεμαχισμένα φύλλα τα οποία μετά το πλύσιμο τεμαχίζονται στο σημείο έναρξης του ελάσματος του φύλλου και συσκευάζονται με ημιπερατές μεμβράνες. Επίσης, η ρόκα χρησιμοποιείται σε διάφορα μείγματα σαλάτας με άλλα φυλλώδη λαχανικά (μαρούλι και σπανάκι) ως νωπά τεμαχισμένα σε μικρά κομμάτια φύλλα. Κύριο ποιοτικό χαρακτηριστικό της ρόκας, είναι το έντονο πράσινο χρώμα των φύλλων. Σοβαρό πρόβλημα στα φυλλώδη λαχανικά είναι η ταχύτατη υποβάθμιση της ποιότητας λόγω του γηρασμού, με τη διάσπαση της χλωροφύλλης να αποτελεί ένα τυπικό σύμπτωμα του.

Περιορισμένες είναι οι πληροφορίες για τη συντήρηση της ρόκας ενώ πρόσφατα δημοσιεύτηκαν κάποια δεδομένα για την επίδραση της ελεγχόμενης ατμόσφαιρας στη διατήρηση της ποιότητας και των αντιοξειδωτικών ουσιών του είδους *Diplotaxis tenuifolia* L. (Martinez-Sanchez et al., 2006).

## 1.8 Βιοϋμένια

Τα βακτήρια στο φυσικό τους περιβάλλον δεν υπάρχουν αποκλειστικά ως ελεύθερα κύτταρα αλλά προσκολλημένα σε κάποιο έμβιο οργανισμό ή σε επιφάνεια. Περιβάλλονται από ένα εξωκυτταρικό πολυμερές υλικό που παράγουν τα ίδια τα βακτήρια δημιουργώντας πολύπλοκες δομές που ονομάζονται βιοϋμένια (biofilms). Με τον όρο βιοϋμένιο νοείται μια μικροβιακή κοινότητα που προσκολλάται σε μια επιφάνεια ή μεσεπιφάνεια, αβιοτική ή όχι, συνήθως εγκλεισμένη σε στρώμα εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών παραγόμενων από τα ίδια τα μικρόβια. Στην προσκολλημένη τους μορφή τα βακτήρια εκφράζουν ένα διαφορετικό

φαινότυπο σε σχέση με τα μη προσκολλημένα. Έτσι, εμφανίζουν νέες ιδιότητες όπως διαφορετικό ρυθμό ανάπτυξης, αυξημένη αντοχή στα απολυμαντικά και στα αντιβιοτικά, αυξημένο ρυθμό ανταλλαγής γενετικού υλικού, αυξημένη δυνατότητα εξουδετέρωσης της άμυνας του ξενιστή και επικοινωνία μεταξύ τους μέσω παραγωγής ειδικών μορίων-σημάτων.

Τα κύρια συστατικά που συνιστούν ένα βιοϋμένιο είναι: τα βακτηριακά κύτταρα, το στρώμα του εξωκυττάριου πολυμερούς (γλυκοκάλυκας) και η επιφάνεια προσκόλλησης. Το 15% του όγκου του βιοϋμενίου αποτελείται από τα κύτταρα των βακτηρίων και το 85% από το γλυκοκάλυκα. Το στρώμα του γλυκοκάλυκα αποτελείται από πολυσακχαρίτες που παράγουν τα ίδια τα βακτήρια, από εξωγενείς ουσίες που ποικίλουν ανάλογα με το περιβάλλον που αναπτύσσεται το βιοϋμένιο, από προϊόντα μεταβολισμού των βακτηρίων και από νερό σε ποσοστό 95-97%. Έτσι, οι ιδιότητες του πολυμερούς ποικίλουν ανάλογα με τη σύνθεση, το στάδιο ωρίμανσης του βιοϋμενίου και το περιβάλλον.

Βιοϋμένια που έχουν σχηματιστεί από τους επίφυτους μικροοργανισμούς έχουν παρατηρηθεί σε διάφορα σημεία στην επιφάνεια του φυτικού ιστού. Πιο συχνά σχηματίζονται στη βάση των φύλλων και συνδέονται με τα τριχίδια. Οι κοινότητες που εγκλείονται στα βιοϋμένια που έχουν παρατηρηθεί στα λαχανικά ήταν Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια. Από τους επίφυτους μικροοργανισμούς στη φυλλόσφαιρα λαχανικών βρέθηκε ότι το 13-38% των βακτηρίων ήταν υπό μορφή βιοϋμενίου. Για να καθοριστεί η επίπτωση που έχουν στην ασφάλεια των λαχανικών πρέπει να γίνει κατανοητή η οικολογία των ετερογενών βιοϋμενίων που σχηματίζονται από τα εντερικά παθογόνα.

### **1.8.1 Χαρακτηριστικά μικροοργανισμών υπό μορφή βιοϋμενίου**

1.8.2 Τα βακτηριακά κύτταρα υπό τη μορφή του βιοϋμενίου παρουσιάζουν κάποιες ιδιότητες-πλεονεκτήματα που αφορούν στην έκφραση των γονιδίων τους, τη δυνατότητα μεταφοράς γονιδίων και την επικοινωνία που αναπτύσσουν μεταξύ τους (Wilson, 2001).

Μετά από την επιτυχημένη προσκόλληση στην επιφάνεια των λαχανικών, αρχίζει να διαφαίνεται κάποια αλλαγή στο φαινότυπο του μικροοργανισμού που οφείλεται στην ενεργοποίηση κάποιων γονιδίων και στην απενεργοποίηση κάποιων άλλων, ώστε να ολοκληρωθεί ο σχηματισμός του βιοϋμενίου. Παρατηρείται δηλαδή αλλαγή ορισμένων μεταβολικών δραστηριοτήτων του μικροοργανισμού όπως για παράδειγμα ο ρυθμός ανάπτυξης, η αναπνοή, η μεταφορά ηλεκτρονίων και η σύνθεση του εξωκυττάριου πολυμερούς (Wilson, 2001).

Για παράδειγμα, στο εντερικό παθογόνο *Escherichia coli*, μετά από την προσκόλληση παρατηρήθηκε τροποποίηση του 38% των γονιδίων. Στο μικροοργανισμό *Pseudomonas aeruginosa*, το γονίδιο *algC*, ένα από τα γονίδια που απαιτούνται για την παραγωγή του αλγινικού, του κύριου συστατικού του εξωκυττάριου πολυσακχαρίτη της, γίνεται πέντε φορές ενεργότερο αμέσως μετά την προσκόλληση, για να απενεργοποιηθεί αμέσως μόλις τα κύτταρα εγκλωβωθούν στο αλγινικό, ενώ το γονίδιο που ευθύνεται για τη βιοσύνθεση του μαστιγίου απενεργοποιείται. Για να σχηματιστεί επομένως βιοϋμένιο δεν αρκεί απλή συνάθροιση κυττάρων όπως συμβαίνει σε καλλιέργειες βακτηρίων σε στερεά θρεπτικά υλικά, αλλά θα πρέπει οι μικροοργανισμοί να εκφράσουν το φαινότυπο που αντιστοιχεί στην προσκολλημένη μορφή τους (Wilson, 2001).

Το βιοϋμένιο αποτελεί ιδανική συνθήκη ανταλλαγής πλασμιδιακού DNA για τα προσκολλημένα βακτηριακά κύτταρα καθώς η σύζευξη πραγματοποιείται σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι ανάμεσα σε πλαγκτονικά κύτταρα. Βακτήρια που διαθέτουν κάποια συζευκτικά πλασμίδια φαίνεται να σχηματίζουν ευκολότερα βιοϋμένια από ανάλογα στελέχη που δεν τα έχουν. Γονίδια των πλασμιδίων αυτών εκφράζουν παράγοντες που ωθούν τα πλαγκτονικά βακτήρια να σχηματίσουν ή να ενσωματωθούν σε βιοϋμένια. Στην προαναφερθείσα μελέτη με το *E. coli* δείχθηκε ότι το F συζευκτικό ινίδιο, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *tra*, το οποίο βρίσκεται στο F πλασμίδιο, δρα ως παράγοντας προσκόλλησης σε αλληλεπιδράσεις κυττάρου-επιφάνειας και κυττάρου-κυττάρου, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός τρισδιάστατου βιοϋμενίου. Επίσης, στελέχη που διαθέτουν πλασμίδιο το μετέφεραν σε άλλα που δεν το είχαν, τα οποία στη συνέχεια μπορούσαν να σχηματίσουν βιοϋμένια. Χωρίς τα πλασμίδια οι ίδιοι αυτοί μικροοργανισμοί δημιουργούσαν μόνο μικροαποικίες χωρίς κάποια περαιτέρω εξέλιξη. Φαίνεται ότι οι μικροοργανισμοί διαθέτουν μηχανισμούς που τους οδηγούν να δημιουργούν ή να ανευρίσκουν τις συνθήκες εκείνες οι οποίες ευνοούν τη διασπορά των γονιδίων που αφορούν σε χαρακτηριστικά σχετιζόμενα με τη διατήρηση και τον πολλαπλασιασμό τους, όπως είναι η αυξημένη μολυσματικότητα. Τέτοια γονίδια μπορεί να βρίσκονται στα πλασμίδια, οπότε μέσα από τη δομή του βιοϋμενίου παρέχεται ο μηχανισμός και οι συνθήκες που θα βοηθήσουν στην επιλογή, την προαγωγή και τη διασπορά των ουσιωδών αυτών χαρακτηριστικών (Wilson, 2001).

Όπως έχει αναφερθεί, η δημιουργία βιοϋμενίου δεν αποτελεί απλή συνάθροιση κυττάρων. Η συγκέντρωση μικροοργανισμών του ίδιου είδους ή και διαφορετικών ειδών οδηγεί σε σχηματισμό βιοϋμενίου μέσα από μηχανισμούς χημικών σημάτων. Τα σήματα αυτά συγκεντρώνονται τοπικά, έξω από το κύτταρο και όταν η συγκέντρωσή τους φτάσει ένα

οριακό σημείο, τότε γίνεται «αντιληπτό» από τα κύτταρα ότι ο πληθυσμός έχει φτάσει σε μια ελάχιστη πυκνότητα και αρχίζει η διαδικασία τροποποίησης της έκφρασης των γονιδίων. Αυτός ο μηχανισμός της χημικής επικοινωνίας που αφορά στην πυκνότητα του πληθυσμού χαρακτηρίζεται ως κυτταρο-κυτταρική επικοινωνία (quorum sensing).

Ο νέος φαινότυπος που εμφανίζουν τα βακτήρια με την ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων μέσω της κυτταρο-κυτταρικής επικοινωνίας τα καθιστά συνήθως περισσότερο λοιμογόνα στην περίπτωση παθογόνων στελεχών, όταν ο πληθυσμός τους φτάσει σε υψηλή πυκνότητα. Επιπλέον, αποκτούν κάποια πλεονεκτήματα που συνοπτικά παρουσιάζονται παρακάτω:

- Χρησιμοποιούν τα θρεπτικά στοιχεία του περιβάλλοντος κατά τον καλύτερο δυνατό τρόπο, εκκρίνοντας σε μεγάλα ποσά τα ανάλογα ένζυμα.
- Προστατεύονται καλύτερα από τους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή, εκκρίνοντας τις τοξικές τους ουσίες σε μεγαλύτερες ποσότητες. Αντίθετα, όταν η έκκριση των λοιμογόνων παραγόντων γίνεται σε μικρές ποσότητες, τότε η άμυνα του ξενιστή κινητοποιείται και μπορεί να τους αντιμετωπίσει.
- Ρυθμίζουν διαδικασίες ανταλλαγής γενετικού υλικού, όπως η σύζευξη.
- Επιτυγχάνουν πιο σωστή δόμηση του βιοϋμενίου.
- Κάποια Gram-αρνητικά βακτήρια παράγουν ενδοτοξίνες κατά το σχηματισμό του βιοϋμενίου.

Η προσκόλληση των μικροοργανισμών στις επιφάνειες και η επακόλουθη ανάπτυξη τους σε δομή βιοϋμενίου μπορεί να θεωρηθεί ως ένας μηχανισμός επιβίωσης. Οι κύριες αιτίες για τη συμπεριφορά αυτή είναι η εύρεση τροφής και η προστασία από τα απολυμαντικά.

Τα βακτήρια έχουν τρόπο να ανευρίσκουν και να εκμεταλλεύονται ακόμα και τις ελάχιστες πηγές θρεπτικών στοιχείων. Συγκεντρώνονται έτσι οργανικές ενώσεις στην επιφάνεια και συμπυκνώνονται οι θρεπτικές ουσίες του περιβάλλοντος από το εξωκυτταρικό πολυμερές. Η σύνθεση διαφορετικών ενζύμων από τα διάφορα είδη αυξάνει τη δυνατότητα διάσπασης ουσιών, που ενδεχομένως το κάθε βακτήριο από μόνο του δεν θα μπορούσε να κάνει (Wilson, 2001).



### 1.8.3 Βιοϋμένια και απολύμανση

Από τη στιγμή που τα βακτηριακά κύτταρα θα προσκολληθούν σε μια επιφάνεια με τη βοήθεια του εξωκυτταρικού πολυμερούς, ένα απλό ξέπλυμα ή ξέπλυμα με απολυμαντικό δεν είναι αρκετό για να τα απομακρύνει. Τα βακτήρια που αναπτύσσονται σε βιοϋμένια εμφανίζουν εκπληκτική αντοχή. Σύμφωνα με τον LeChevallier (1998), είναι 150-3000 φορές περισσότερο ανθεκτικά στο ελεύθερο χλώριο και 2-100 φορές πιο ανθεκτικά στις μονοχλωραμίνες από ότι τα πλαγκτονικά κύτταρα.

Στην πραγματικότητα, τα βακτήρια των βιοϋμενίων δεν είναι περισσότερο ανθεκτικά αλλά περιβάλλονται από το γλυκοκάλυκα που τους παρέχει προστασία. Το απολυμαντικό μέχρι να φτάσει στα κύτταρα θα πρέπει να αντιδράσει με τον πολυσακχαρίτη αναλώνοντας έτσι την οξειδωτική του δράση πριν φτάσει σε αυτά. Επιπλέον, η πρόσληψη απολυμαντικού από τα προσκολλημένα κύτταρα περιορίζεται από την ταχύτητα διάχυσης του απολυμαντικού στο βασικό υδροδυναμικό στρώμα και το βιοϋμένιο. Έτσι, απαιτείται υψηλότερη συγκέντρωση και μεγαλύτερος χρόνος επαφής για το απολυμαντικό για να φτάσει στα προσκολλημένα κύτταρα σε σχέση με τα πλαγκτονικά (Beuchat, 2002).

Η δημιουργία αποικιών από αλλοιογόνους και μη αλλοιογόνους μικροοργανισμούς σε λαχανικά και σε επιφάνειες επαφής μετά τη συγκομιδή παρέχει ένα προστατευτικό περιβάλλον για τους παθογόνους μικροοργανισμούς μειώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα των απολυμαντικών και άλλων ανασταλτικών παραγόντων. Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* σε ένα βιοϋμένιο που συνυπήρχαν και τα είδη *Pseudomonas fragi* και *Staphylococcus xylosus* έχει αναφερθεί ότι παρέμεινε ανεπηρέαστος έπειτα από κατεργασία με 500 ppm ελεύθερου χλωρίου (Norwood et al., 2000). Ο Fett (2000) εξέτασε τις κοτυληδόνες, το υποκοτύλιο και τις ρίζες μηδικής, μπρόκολου και λάχανου και παρατηρήθηκαν βιοϋμένια σε αυτά τα τμήματα των φυτών. Κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα φυσικά ευρισκόμενα βιοϋμένια στους βλαστούς μπορούν να δημιουργήσουν ειδικές προστατευόμενες περιοχές για αποικισμό από παθογόνα όπως *Salmonella spp.* και *E. coli* O157:H7 καθιστώντας δύσκολη την εξάλειψη τους με αντιμικροβιακές ουσίες. Ο σχηματισμός βιοϋμενίων σε επιφάνειες φύλλων μαρουλιού, κινέζικου λάχανου, σέλινου, πράσου και βασιλικού έχει αποδειχθεί. Έπειτα από εκτιμήσεις των βιοϋμενίων στη φυλλόσφαιρα θεωρείται ότι τα βιοϋμένια αποτελούν το 10-40% του βακτηριακού πληθυσμού (Beuchat, 2002).

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της ωρίμανσης των λαχανικών καθώς και κατά τη συγκομιδή, μεταφορά, επεξεργασία και αποθήκευση μετά την επεξεργασία, προκύπτουν δυνατότητες για την ανάπτυξη βιοϋμενίου. Αυτά τα βιοϋμένια παρέχουν προστασία ενάντια στα απολυμαντικά προκαλώντας ανησυχία για την ασφάλεια των λαχανικών. Η ικανότητα των παθογόνων μικροοργανισμών να επιβιώσουν σε βιοϋμένια που έχουν υποβληθεί σε αφυδάτωση και επεξεργασία με απολυμαντικά πρέπει να προσδιοριστεί.

## **1.9 Σκοπός της μελέτης**

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Salmonella enterica* serovar Typhimurium στη ρόκα υπό διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και σε διαφορετικά μέσα. Επίσης, μελετήθηκε η γονιδιακή έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το σχηματισμό βιοϋμενίων, παθογένειας και άλλων λειτουργικών ρόλων υπό τις συνθήκες αυτές.

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Βακτηριακό στέλεχος

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκε το στέλεχος *Salmonella enterica* serovar Typhimurium CDC 6516-60 (ATCC 14028) που ανήκει στη συλλογή μικροοργανισμών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και έχει απομονωθεί από πουλερικά.

### 2.2 Συνθήκες ανάπτυξης

Το βακτηριακό στέλεχος αναπτύχθηκε σε διάφορα θρεπτικά μέσα ανάπτυξης στους 20°C και στους 10°C. Στον Πίνακα 2.1 παρουσιάζονται τα διάφορα θρεπτικά μέσα ανάπτυξης που παρασκευάστηκαν και οι αντίστοιχοι κωδικοί αυτών.

Πίνακας 2.1 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης

Κωδικός	Επεξήγηση
LB	LB BROTH
R	Εκχύλισμα ρόκας
LBA	LB AGAR
RA	Εκχύλισμα ρόκας με AGAR
Tissue	Φυτικός ιστός
Tissue S	Φυτικός ιστός από την πλευρά των στοματίων

<sup>1</sup>Οι αριθμοί 1 και 2 στα δείγματα αντιστοιχούν στους 20°C ενώ οι αριθμοί 4 και 5 αντιστοιχούν στους 10°C.

Η κάθε ανανέωση του στελέχους πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 10μL ενεργούς καλλιέργειας αυτού σε 10ml LB Broth.

### 2.3 Προετοιμασία φυτικού ιστού και θρεπτικού υποστρώματος εκχυλίσματος ρόκας

Η προμήθεια της ρόκας έγινε από συνοικιακό οπωροπωλείο μια ημέρα πριν τη διεξαγωγή του πειράματος. Την ημέρα του πειράματος, ολόκληρη η ποσότητα της ρόκας πλύθηκε με νερό βρύσης και έπειτα αφαιρέθηκε η περίσσεια υγρασίας. Δείγματα ρόκας τοποθετήθηκαν με αποστειρωμένη λαβίδα σε τετράγωνα τρυβλία πλευράς 10 εκατοστών και συντηρήθηκαν στους 4°C μέχρι τον εμβολιασμό τους, ενώ ορισμένα φύλλα ρόκας χρησιμοποιήθηκαν για την καταμέτρηση της αρχικής μικροβιακής χλωρίδας. Η υπόλοιπη ποσότητα χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος εκχυλίσματος ρόκας.

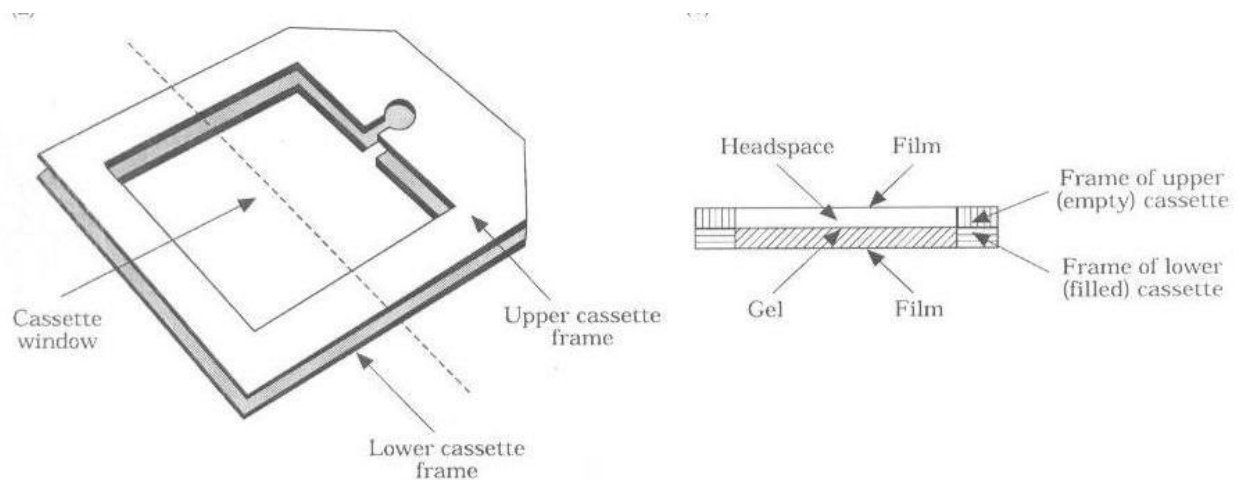
Για την παρασκευή του εκχυλίσματος, σε ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκε ψιλοκομμένη η υπόλοιπη ρόκα και προστέθηκε απιονισμένο νερό σε ίση αναλογία. Το διάλυμα παρέμεινε στους 4°C για 4 ώρες και γινόταν πίεση ανά 30 λεπτά. Μετά το πέρας των 4 ωρών, το διάλυμα διηθήθηκε, και ποσότητα 20mL τοποθετήθηκε σε γυάλινες φιάλες (Duran) για την προετοιμασία των δειγμάτων υγρής καλλιέργειας. Αντίστοιχα για την παρασκευή του στερεού εκχυλίσματος προστέθηκε 15g/L άγαρ. Ακολούθησε θερμική αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά..



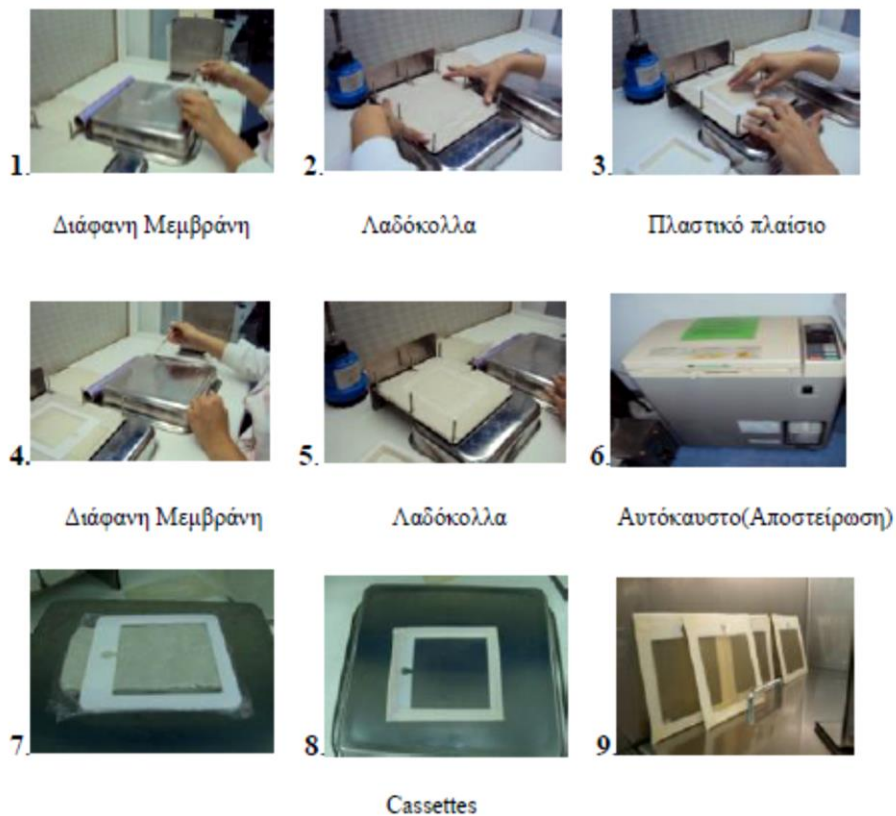
**Εικόνα 2.1** Φύλλα ρόκας

## 2.4 Προετοιμασία της στερεής μήτρας ανάπτυξης

Η στερεή μήτρα ανάπτυξης (Gel Cassettes) είναι μία κατασκευή η οποία αποτελείται από ένα πλαστικό πλαίσιο πάχους 2 χιλιοστών (mm) με εξωτερικές διαστάσεις 130 x 145 mm και από ένα «παράθυρο» εσωτερικά του πλαισίου διαστάσεων 100 x 100 mm (εικόνα 2.2). Για την προετοιμασία της στερεής μήτρας ανάπτυξης (εικόνα 2.3) το πλαίσιο καλύφθηκε με μεμβράνη οικιακής χρήσης και σφραγίστηκε θερμικά με αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 λεπτά (Brocklehurst et al. 1997).



**Εικόνα 2.2** Σχέδιο της στερεής μήτρας ανάπτυξης (gel cassettes) για την ανάπτυξη επιφανειακών αποικιών



Εικόνα 2.3 Προετοιμασία της στερεής μήτρας ανάπτυξης (gel cassettes)

## 2.5 Εμβολιασμός δειγμάτων

### 2.5.1 Gel cassettes

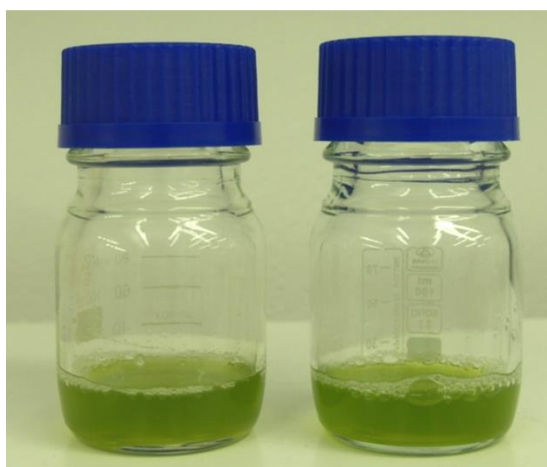
Αρχικά γίνεται η πλήρωση των Gel Cassettes με LB agar και με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ρόκας. Αφήνονται έως ότου στερεοποιηθεί το υλικό και έπειτα εμβολιάζονται με 10-15 κύτταρα ανά τετραγωνικό εκατοστό του μικροοργανισμού *Salmonella enterica* serovar Typhimurium CDC 6516-60. Στη συνέχεια, ακολουθεί εξάπλωση του εμβολίου με πλαστικό κρίκο μιας χρήσης σε όλη την επιφάνεια του υλικού. Τέλος, σφραγίζεται το σημείο εισόδου της πιπέτας εμβολιασμού και του κρίκου εξάπλωσης με χάρτινη ταινία για εξασφάλιση ασηπτικών συνθηκών επώασης. Τα Gel Cassettes τοποθετήθηκαν για επώαση στους 20°C και στους 10°C (εικόνα 2.4).



**Εικόνα 2.4** Διαδικασία πλήρωσης της στερεής μήτρας ανάπτυξης

### 2.5.2 Υγρό θρεπτικό υπόστρωμα

Το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB (LB Broth) και το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα ρόκας τοποθετήθηκαν σε γυάλινες φιάλες (Duran) των 100ml. Το κάθε δείγμα είχε όγκο 20ml. Τα δείγματα αυτά αφού προηγουμένως είχαν αποστειρωθεί εμβολιάστηκαν με πιπέτα με 10-15 κύτταρα ανά ml του μικροοργανισμού *Salmonella enterica* serovar Typhimurium CDC 6516-60.



**Εικόνα 2.5** Δείγμα υγρού θρεπτικού υποστρώματος ρόκας

### 2.5.3 Φυτικός ιστός

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω (παρ. 2.3), τα δείγματα του φυτικού ιστού τοποθετήθηκαν σε τετράγωνα τρυβλία πλευράς 10 εκατοστών με το φυτικό ιστό να καλύπτει όσο το δυνατόν περισσότερο την επιφάνεια του τρυβλίου. Στα μισά δείγματα, τα φύλλα ρόκας στα τρυβλία ήταν τοποθετημένα από την πλευρά των στοματίων. Ο φυτικός ιστός εμβολιάστηκε με 10-15 κύτταρα ανά τετραγωνικό εκατοστό του μικροοργανισμού *Salmonella enterica* serovar Typhimurium CDC 6516-60. Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε με τοποθέτηση του εμβολίου με πιπέτα πάνω στο φυτικό ιστό και με μετέπειτα εξάπλωση του με πλαστικό κρίκο μιας χρήσης.

Παράλληλα με τον εμβολιασμό των δειγμάτων φυτικού ιστού πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία για την καταμέτρηση της αρχικής ολικής μικροβιακής χλωρίδας. Ως εργαστηριακό θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το LB και η επώση των τρυβλίων έγινε στους 30°C και στους 37°C.

## 2.6 Απαρίθμηση Μικροβιακού Πληθυσμού

### 2.6.1 Στερεή μήτρα ανάπτυξης (Gel cassettes) και φυτικός ιστός

Το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα αφαιρείται ασηπτικά με αποστειρωμένη λαβίδα από την στερεή μήτρα ανάπτυξης και τοποθετείται σε σακούλα Stomacher με φίλτρο, στην οποία προστίθεται Ringer (20 ml). Ακολουθούν μαλάξεις μέχρι την πλήρη διαλυτοποίησή του. Ομοίως, ο εμβολιασμένος φυτικός ιστός τοποθετείται σε σακούλα Stomacher με φίλτρο, στην οποία προστίθεται Ringer (20 ml) και ακολουθούν μαλάξεις με στόχο την απομάκρυνση από το φυτικό ιστό τόσο των επιφανειακών όσο και των εσωτερικευμένων κυττάρων του μικροοργανισμού. Έπειτα 1 ml από το εκάστοτε ομογενοποιημένο δείγμα χρησιμοποιείται για τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων και την απαρίθμηση του μικροβιακού πληθυσμού. Ακολουθεί η επίστρωση των τρυβλίων θρεπτικού υποστρώματος LB. Στην περίπτωση των δειγμάτων φυτικού ιστού πραγματοποιήθηκε επίστρωση και σε τρυβλία επιλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος XLD.

Η υπόλοιπη ποσότητα δείγματος φυγοκεντρείται (5.000g για 10 λεπτά) για την παραλαβή της βιομάζας. Η βιομάζα, αφού πρώτα αφαιρεθεί το υπερκείμενο, επαναιωρείται με 1ml



Ringer και φυγοκεντρείται ξανά (9.000g για 10 λεπτά). Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά, προστίθεται διάλυμα RNA Later και τα κύτταρα διατηρούνται για μια ημέρα στους 4°C και έπειτα σε βαθιά κατάψυξη (-80°C).

## **2.6.2 Υγρές καλλιέργειες**

Από κάθε δείγμα λαμβάνεται 1ml για τη μέθοδο των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων και την απαρίθμηση του μικροβιακού πληθυσμού. Ακολουθεί η επίστρωση των τρυβλίων θρεπτικού υποστρώματος LB.

Η υπόλοιπη ποσότητα του δείγματος χρησιμοποιείται για την παραλαβή της βιομάζας και ακολουθείται η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.6.1.

## **2.7 Έλεγχος έκφρασης γονιδίων**

### **2.7.1 Απομόνωση RNA (RNA extraction)**

Για την απομόνωση του RNA εφαρμόστηκε η τεχνική που περιγράφεται στο εμπορικό σκεύασμα The PureLink® RNA Kit (Ambion). Συγκεκριμένα, αρχικά τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (rt). Μετά τη φυγοκέντρωση προστίθενται 100μL του διαλύματος λυσοζύμης και ακολουθεί ομογενοποίηση με vortex. Έπειτα προστίθενται 0,5μL 10% SDS και ακολουθεί vortex. Τα δείγματα επωάζονται για 5min σε rt. Μετά από την επώαση προστίθενται 350μL Lysis Buffer και ακολουθεί ομογενοποίηση με vortex. Τέλος, γίνεται καλή ανάδευση του μίγματος με τη χρήση πιπέτας και ακολουθεί φυγοκέντρωση (12.000 g για 2min σε rt). Μετά τη φυγοκέντρωση το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο RNA-free eppendorf. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 250μL 100% αιθανόλη και ακολουθεί ομογενοποίηση με vortex. Στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρονται σε στήλες φυγοκέντρου και ακολουθεί φυγοκέντρωση (12.000 g για 15 sec σε rt). Μετά την απομάκρυνση της κινητής φάσης προστίθενται 350μL Wash Buffer I, ακολουθεί φυγοκέντρωση (12.000 g για 15sec σε rt) και απομάκρυνση της ροής. Έπειτα προστίθενται σε κάθε δείγμα 80μL 10x μίγμα DNase και ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 15min σε rt. Ακολουθεί προσθήκη 350μL Wash Buffer I και φυγοκέντρωση (12.000 g για 15 sec σε rt). Οι στήλες που συγκρατούν τα δείγματα μεταφέρονται σε νέο tube και προστίθενται 500μL Wash Buffer II. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρώνται (12.000 g για 15 sec σε rt), απομακρύνεται η κινητή φάση και προστίθενται πάλι 500μL Wash Buffer

II. Ακολουθεί φυγοκέντρωση (12.000 g για 15 sec σε rt), απομάκρυνση της κινητής φάσης και τα δείγματα φυγοκεντρούνται (12.000 g για 1 min σε rt). Η στήλη μεταφέρεται σε νέο eppendorf και στα δείγματα προστίθεται 30μl RNase free water και ακολουθεί επώαση για 1 min σε rt. Έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρούνται (12.000 g για 2 min) και επαναλαμβάνεται το τελευταίο βήμα για άλλη μία φορά. Μικρή ποσότητα δείγματος μετριέται με νανοφωτόμετρο ενώ τα τελικά δείγματα αποθηκεύονται στους -80°C μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.

### **2.7.2 Μετατροπή RNA σε cDNA (DNA synthesis)**

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε περιγράφεται στο σκεύασμα Primescript Reverse Transcriptase (Takara). Συγκεκριμένα, ένα σύνολο 18-20 ng RNA αναμίχθηκε με 10mM dNTP's και 50 pmol Random primer hexamers σε τελικό όγκο 10 μl. Το μίγμα RNA/εκκινητή επωάζεται στους 65°C για 5 min και έπειτα τοποθετείται αμέσως στον πάγο. Κάθε δείγμα αναμίχθηκε με μίγμα 5x Primescript Buffer, RNase inhibitor (20 units), Primescript Reverse Transcriptase (200 units) και RNase free H<sub>2</sub>O ώστε ο τελικός όγκος του δείγματος να είναι 20μl. Ακολουθεί ανάμειξη και επώαση των δειγμάτων (30°C για 10min, 42°C για 60min και 70°C για 15min). Τα δείγματα cDNA αποθηκεύονται στους -20°C μέχρι περαιτέρω χρήση τους.

### **2.7.3 Real Time PCR**

Η αντίδραση της Real Time PCR πραγματοποιήθηκε σε 96 well plates με το σύστημα ανίχνευσης StepOnePlus (Applied Biosystems) και με τη χρήση της χρωστικής SYBR GREEN για την ανίχνευση του προϊόντος. Σε κάθε αντίδραση προστέθηκε SYBR GREEN Master mix, 200nM από κάθε εκκινητή (Πίνακας 2.2) και το cDNA. Τα στάδια της αντίδρασης ήταν τα ακόλουθα: 3 min στους 95°C και 40 κύκλοι από 95°C για 20 sec, 60°C για 30 sec. Η εξειδίκευση της PCR ελέγχθηκε με τις καμπύλες τήξης (melting curves) οι οποίες προέκυψαν από τη θέρμανση των δειγμάτων στους 95°C και μετά από την ψύξη τους στους 60°C που ακολουθήθηκε από επαναθέρμανση τους με ρυθμό 0,3°C/min στους 95°C για την ανίχνευση της χρωστικής SYBR GREEN. Τα προφίλ των καμπυλών τήξης αναλύθηκαν με χρήση του λογισμικού StepOne 2.1 (Applied Biosystems).

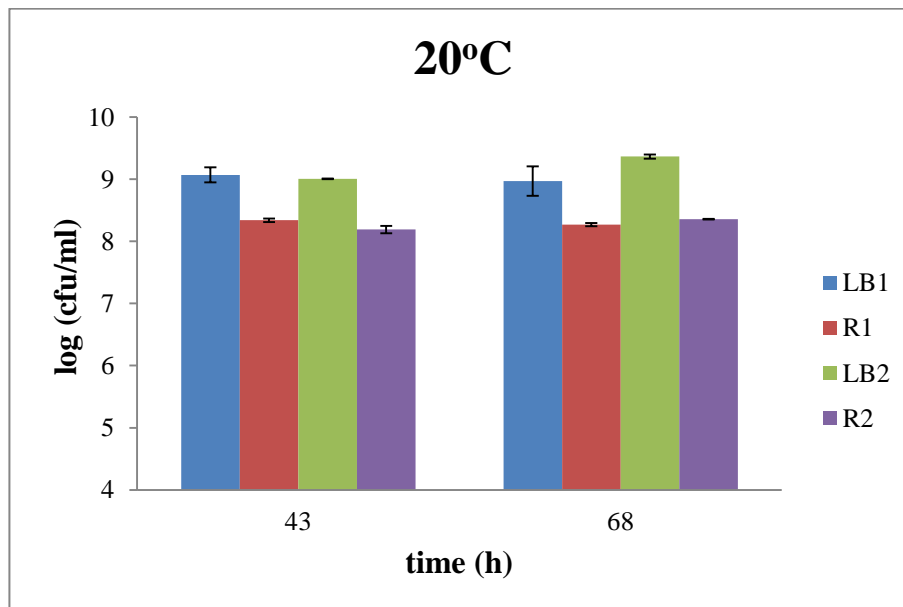
**Πίνακας 2.2** Γονίδια στόχοι που αναλύθηκαν με την Real-Time PCR και εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν

<b>Γονίδιο</b>	<b>Λειτουργικός ρόλος</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>
Dps	Starvation, stress response	ATGCGCGGTGCTAACTTTAT	AAGTGATCCTGCACGTTATGG
dppA	Membrane transport, adaptation to nutrient deficiency	TTGACCGTCTGGTCTTCTCC	GACATCATCCAGCGGTTTTT
csgB	Attachment	AGTGCCAGAGTACGCCAGGA	ACCGTAAGCGCTTTGCGATA
rpoH	Starvation	CGTTAAAGTTGCAACCACGA	CCATCTCACGCACGTCTTTA
sidA	Involved in cell division control and quorum sensing	ACGCGCAATGTTGTTACGC	ACCCACGCCGGAGGATAAGT
sspH2	Effector protein, induced by SPI-2 ssrA, pathogenicity	GCACAACCTGGCTGAAGATGA	TCGTATTGCCCTTTTTCTGC
osmY	rpoS dependent gene, induced by osmotic stress and growth phase signals	GTCACCCTGAGCGGCTTTGT	CTTCACTGGTCGTGGCCGTA

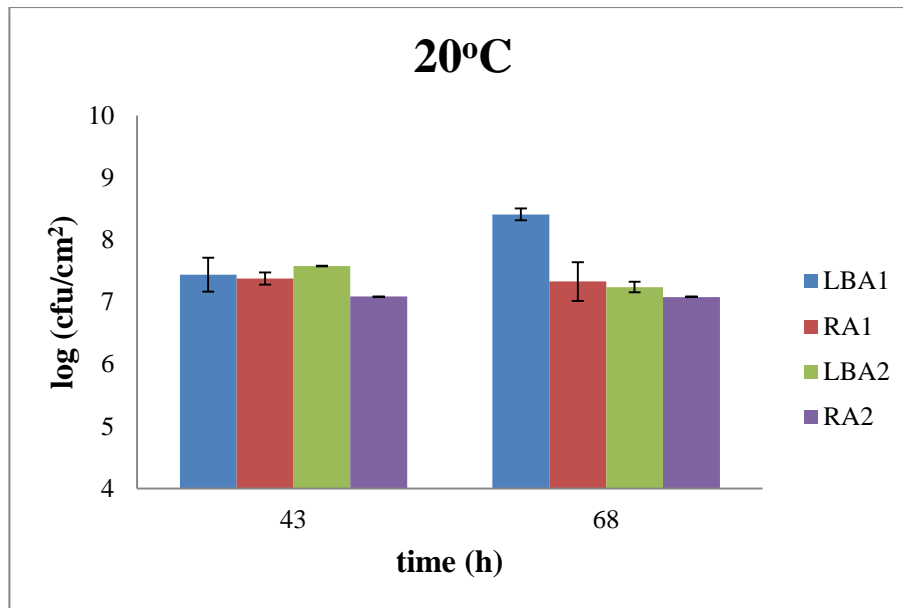
### 3 Αποτελέσματα

#### 3.1 Απαρίθμηση Μικροβιακού Πληθυσμού

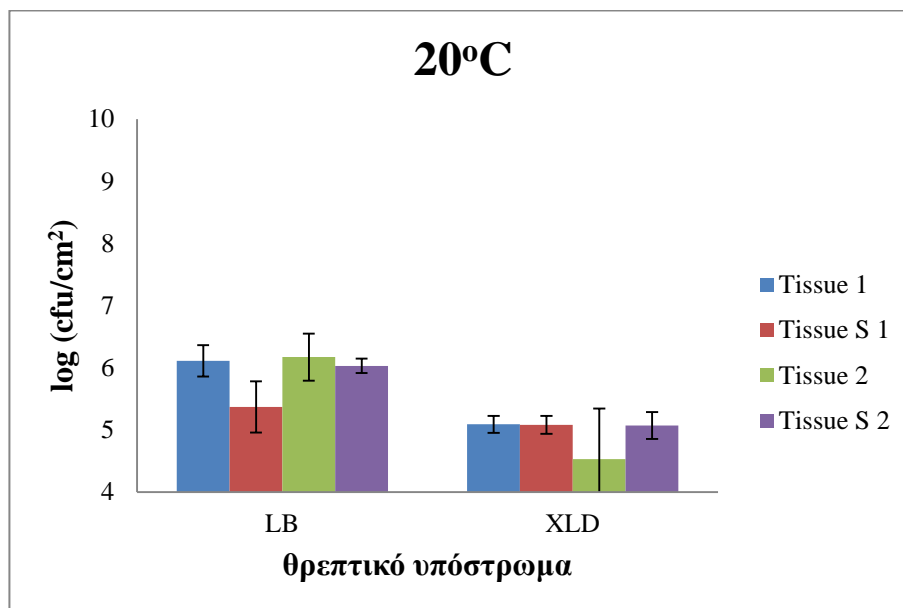
Στα γραφήματα 3.1.1, 3.1.2 και 3.1.3 παρουσιάζεται ο μικροβιακός πληθυσμός στα υγρά, στερεά θρεπτικά υποστρώματα και στον φυτικό ιστό στους 20°C, αντίστοιχα.



**Γράφημα 3.1.1** Ανάπτυξη του στελέχους *Salmonella enterica* serovar Typhimurium στους 20°C σε δείγματα υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB (LB1, LB2) και εκχυλίσματος ρόκας (R1, R2)



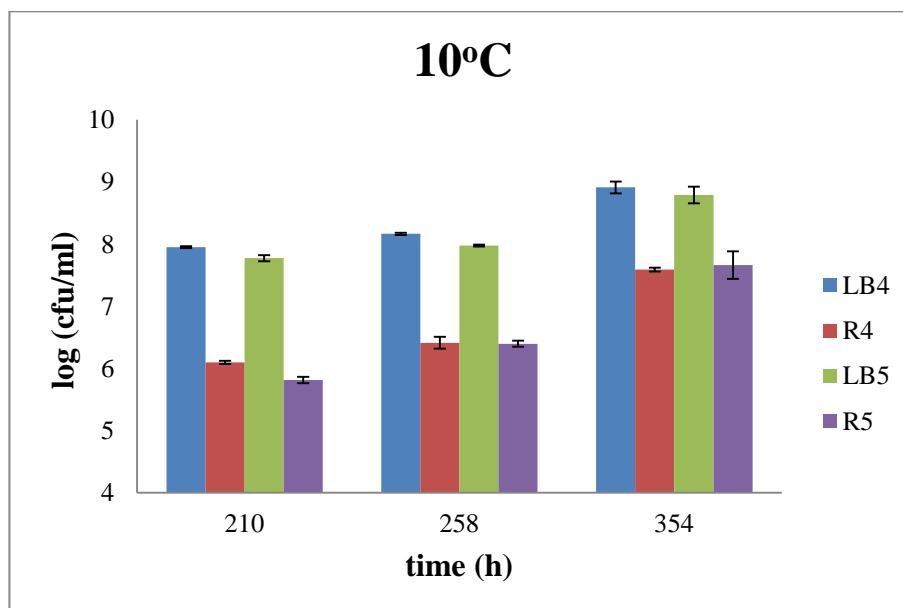
**Γράφημα 3.1.2** Ανάπτυξη του στελέχους *Salmonella enterica* serovar Typhimurium στους 20°C σε δείγματα στερεού θρεπτικού υποστρώματος (Gel Cassette) LB (LBA1, LBA2) και εκχυλίσματος ρόκας (RA1, RA2)



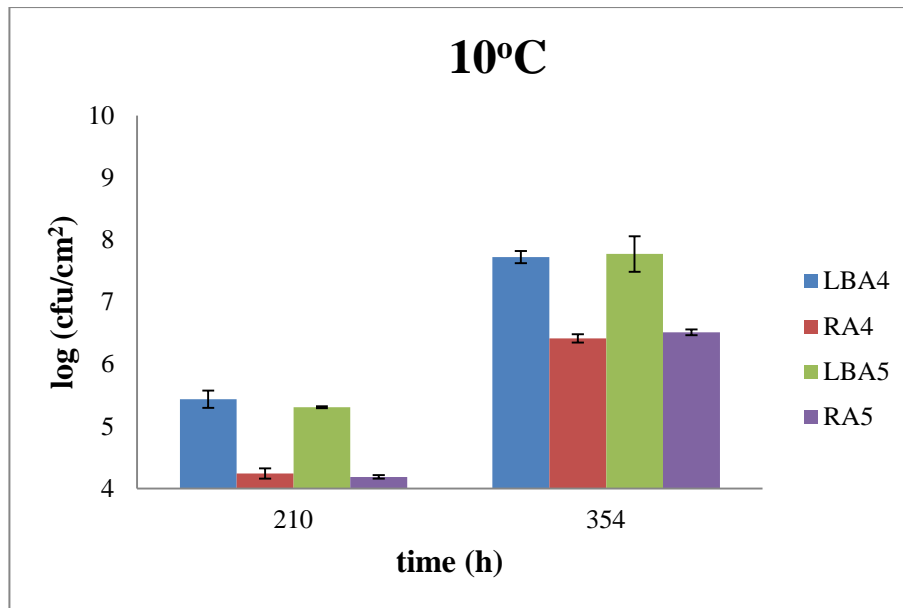
**Γράφημα 3.1.3** Ανάπτυξη του στελέχους *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (XLD) στους 20°C σε δείγματα φυτικού ιστού ρόκας από την επιφάνεια (Tissue 1, Tissue 2) και από την πλευρά των στοματίων (Tissue S 1, Tissue S 2) παρουσία της ενδογενούς χλωρίδας (LB). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στις 68 ώρες

Από τα γραφήματα 3.1.1 και 3.1.2 φαίνεται ότι στα δείγματα εκχυλίσματος ρόκας η ανάπτυξη του στελέχους *Salmonella enterica* serovar Typhimurium είναι μικρότερη. Αυτό το φαινόμενο φαίνεται πιο έντονα στο υγρό θρεπτικό υποστρώμα όπου τόσο στις 43 όσο και στις 68 ώρες μεταξύ των δειγμάτων υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB και των δειγμάτων εκχυλίσματος ρόκας υπάρχει μια διαφορά της τάξεως του ενός λογαρίθμου. Αναφορικά με τα δείγματα στερεής μήτρας ανάπτυξης (gel cassettes) φαίνεται ότι στις 68 ώρες υπάρχει διαφορά ενός λογαρίθμου, ωστόσο στις 43 ώρες φαίνεται ότι ο πληθυσμός του μικροοργανισμού βρίσκεται σε παρόμοια επίπεδα και στα δύο θρεπτικά υποστρώματα. Τέλος, όσον αφορά τα δείγματα φυτικού ιστού στο γράφημα 3.1.3 γίνεται αντιληπτό ότι δεν υπάρχουν αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ των δειγμάτων όπου ο εμβολιασμός είχε πραγματοποιηθεί στην επιφάνεια ή στην πλευρά των στοματίων.

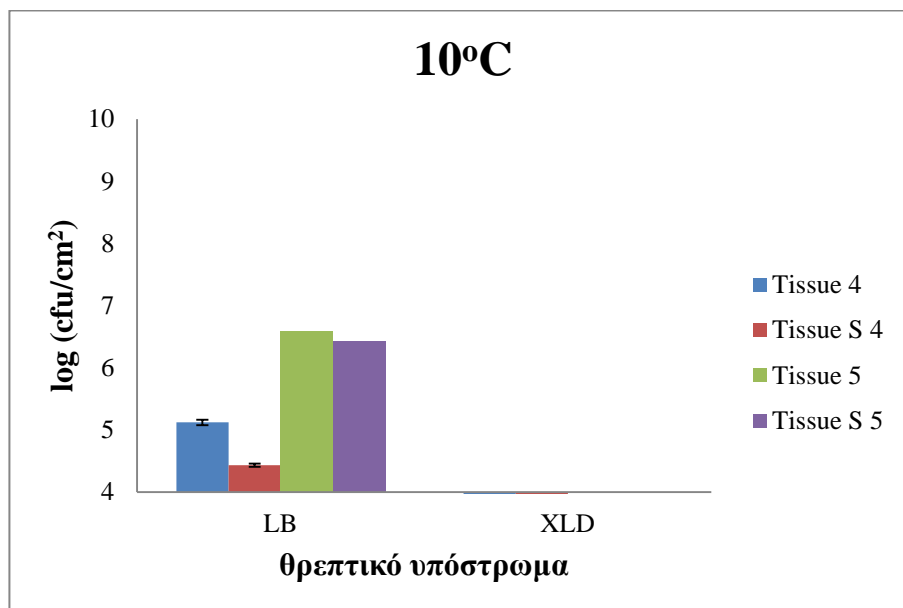
Στα γραφήματα 3.1.4, 3.1.5 και 3.1.6 παρουσιάζεται ο μικροβιακός πληθυσμός στα υγρά, στερεά θρεπτικά υποστρώματα και στον φυτικό ιστό στους 10°C, αντίστοιχα



**Γράφημα 3.1.4** Ανάπτυξη του στελέχους *Salmonella enterica* serovar Typhimurium στους 10°C σε δείγματα υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB (LB4, LB5) και εκχυλίσματος ρόκας (R4, R5)



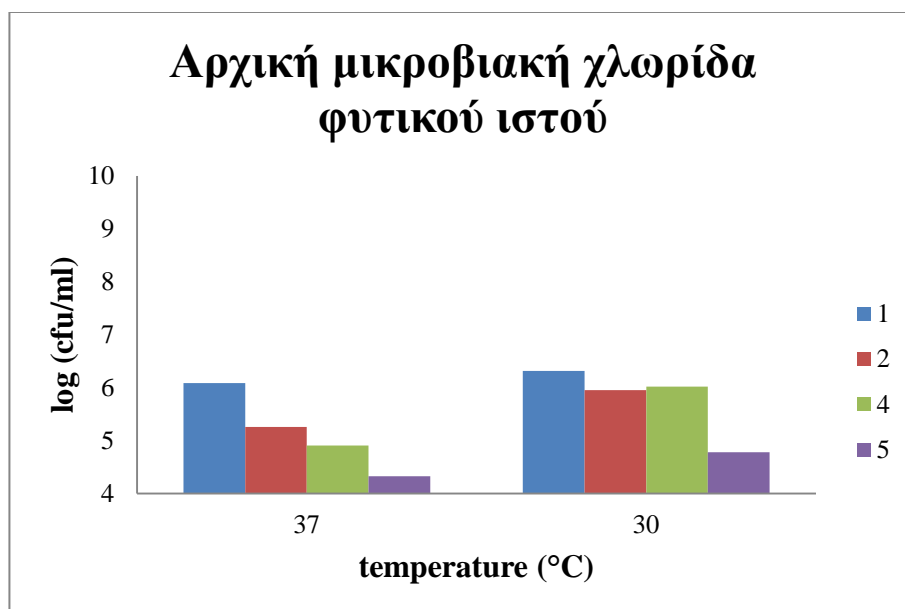
**Γράφημα 3.1.5** Ανάπτυξη του στελέχους *Salmonella enterica* serovar Typhimurium στους 10°C σε δείγματα στερεού θρεπτικού υποστρώματος (Gel cassette) LB (LBA4, LBA5) και εκχυλίσματος ρόκας (RA4, RA5)



**Γράφημα 3.1.6** Ανάπτυξη του στελέχους *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (XLD) στους 10°C σε δείγματα φυτικού ιστού ρόκας στην επιφάνεια (Tissue 4, Tissue 5) και στην πλευρά των στοματίων (Tissue S 4, Tissue S 5) παρουσία της ενδογενούς χλωρίδας (LB). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στις 186 ώρες.

Από τα γραφήματα 3.1.4 και 3.1.5 φαίνεται πως στο εκχύλισμα ρόκας η ανάπτυξη του στελέχους *Salmonella enterica* serovar Typhimurium είναι μικρότερη. Το ίδιο φαινόμενο έχουμε και στους 20°C όπως αναφέρθηκε και παραπάνω όμως λόγω χαμηλότερης θερμοκρασίας το μικροβιακό φορτίο είναι μικρότερο παρόλο που ο χρόνος επώασης των δειγμάτων ήταν μεγαλύτερος. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε ότι στα υγρά θρεπτικά υποστρώματα η διαφορά του μικροβιακού πληθυσμού μεταξύ του υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB και του εκχυλίσματος ρόκας αρχικά (210 ώρες) ήταν της τάξεως των δύο λογαρίθμων όμως στις 354 ώρες η διαφορά αυτή μειώθηκε στον ένα λογάριθμο. Επιπρόσθετα, στα στερεά θρεπτικά υποστρώματα (gel cassettes) υπάρχει διαφορά μεταξύ των δειγμάτων όμως καθόλη τη διάρκεια του πειράματος η διαφορά ήταν ένας λογάριθμος. Τέλος, αναφορικά με τα δείγματα του φυτικού ιστού δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων όπου ο εμβολιασμός είχε πραγματοποιηθεί στην επιφάνεια και την πλευρά των στοματίων.

Στο γράφημα 3.1.7 παρουσιάζεται η αρχική μικροβιακή χλωρίδα του φυτικού ιστού που χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία των δειγμάτων 20°C και 10°C έπειτα από επώαση των τρυβλίων στους 37°C και στους 30°C.



**Γράφημα 3.1.7** Αρχική μικροβιακή χλωρίδα του φυτικού ιστού που χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία των δειγμάτων 20°C και 10°C έπειτα από επώαση στους 37°C και στους 30°C



Συγκρίνοντας το γράφημα 3.1.7 με το γράφημα 3.1.3 για τους 20°C και με το γράφημα 3.1.6 για τους 10°C γίνεται αντιληπτό ότι στην πλειονότητα των περιπτώσεων το μικροβιακό φορτίο των εντεροβακτηρίων αυξήθηκε. Συγκεκριμένα, στα δειγμάτων που επώαστηκαν στους 20°C παρατηρείται αύξηση τη τάξεως του ενός λογαρίθμου ενώ στα δείγματα που επώαστηκαν στους 10°C παρατηρείται αύξηση τη τάξεως των δύο λογαρίθμων. Αναφορικά με την ολική μεσόφιλη μικροχλωρίδα (30°C) του φυτικού ιστού παρατηρείται ότι κυμάνθηκε μεταξύ 4.80 και 6.30 cfu/ml.

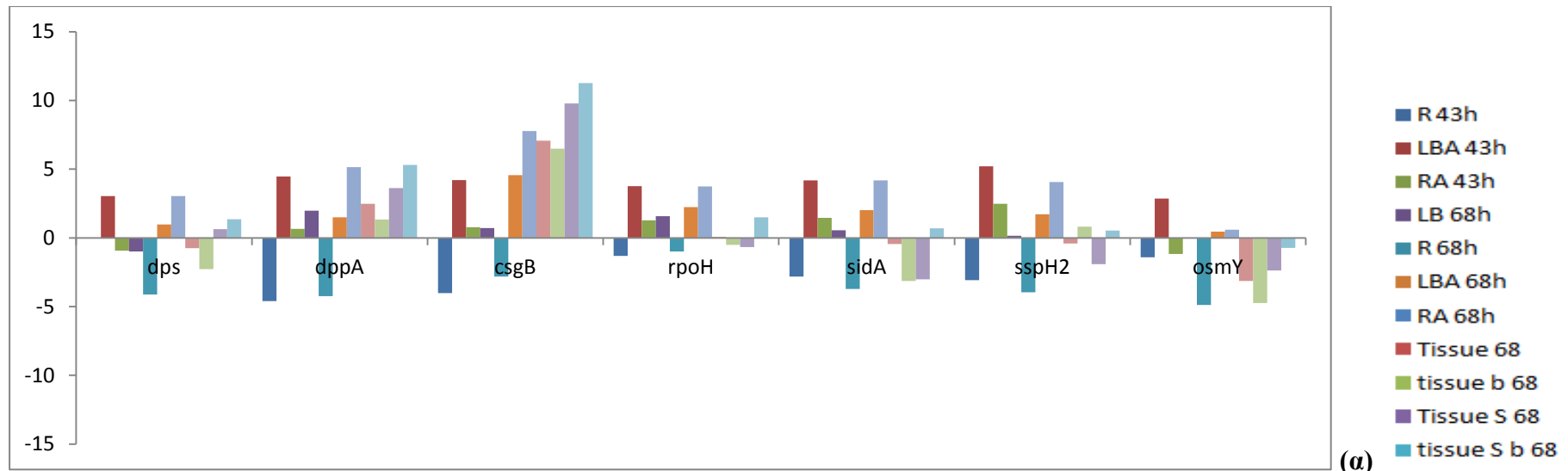
Η παραλλακτικότητα στις μετρήσεις οφείλεται στο γεγονός ότι σε κάθε επανάληψη του πειράματος χρησιμοποιόταν διαφορετική παρτίδα φυτικού ιστού ρόκας.

### **3.2 Έλεγχος έκφρασης γονιδίων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμέρασης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)**

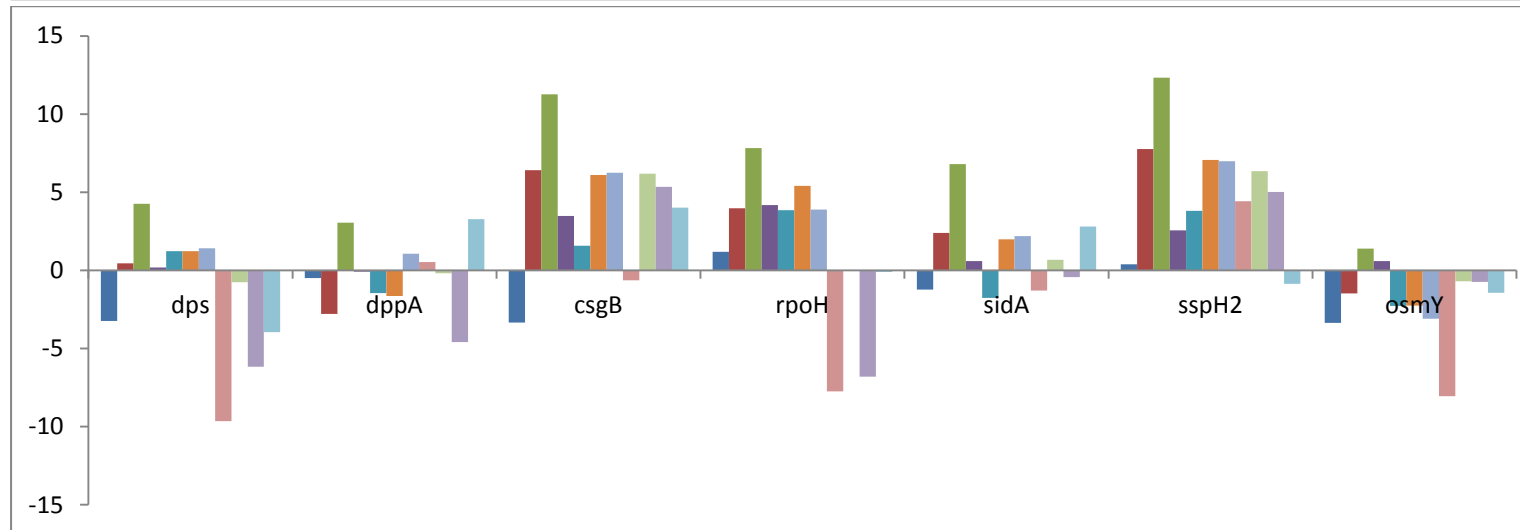
Με τη τεχνική της Real Time PCR μελετήθηκαν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που αναφέρονται στον Πίνακα 2.2 σε κύτταρα του στελέχους *Salmonella enterica* serovar Typhimurium που είχαν αναπτυχθεί στις διαφορετικές συνθήκες που περιγράφονται στον Πίνακα 2.1 στους 20°C και στους 10°C. Προκειμένου να ελεγχθούν τα σφάλματα που εισάγονται από τις διαφορές στις συγκεντρώσεις του ολικού RNA του μικροοργανισμού επιλέχθηκε ένα γονίδιο (*irsG*) του οποίου η έκφραση παραμένει σταθερή ανεξαρτήτως του μέσου και της θερμοκρασίας ανάπτυξης (*housekeeping gene*). Τα σχετικά επίπεδα στη γονιδιακή έκφραση προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , όπου  $\Delta\Delta C_T = (C_{T,target} - C_{T,reference})_{test} - (C_{T,target} - C_{T,reference})_{control}$  (Livak και Schmittgen, 2001), όπου ως αναφορά χρησιμοποιήθηκε για τους 20°C δείγμα υγρού εργαστηριακού θρεπτικού μέσου ανάπτυξης 43 ωρών ενώ για τους 10°C δείγμα εργαστηριακού θρεπτικού μέσου ανάπτυξης 210 ωρών.

Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων – στόχων του στελέχους *Salmonella enterica* serovar Typhimurium σε διαφορετικά μέσα ανάπτυξης σε δύο βιολογικές επαναλήψεις στους 20°C και στους 10°C παρουσιάζονται στα γραφήματα 3.2.1 και 3.2.2. Παρατηρήθηκαν αρκετές διακυμάνσεις ως προς την έκφραση των γονιδίων – στόχων στα διάφορα μέσα ανάπτυξης μεταξύ των δύο βιολογικών επαναλήψεων. Γεγονός που πιθανώς να αποδίδεται στην παραλλακτικότητα που παρουσιάζει ο φυτικός ιστός καθώς σε κάθε επανάληψη η παρασκευή του φυτικού ιστού γινόταν με χρήση διαφορετικής παρτίδας ρόκας. Επιπλέον, όπως φαίνεται στα παρακάτω γραφήματα, στα δείγματα φυτικού ιστού στους 10°C

ήταν αδύνατη η μέτρηση της έκφρασης των γονιδίων – στόχων λόγω του χαμηλού μικροβιακού πληθυσμού που παρατηρήθηκε στα δείγματα.

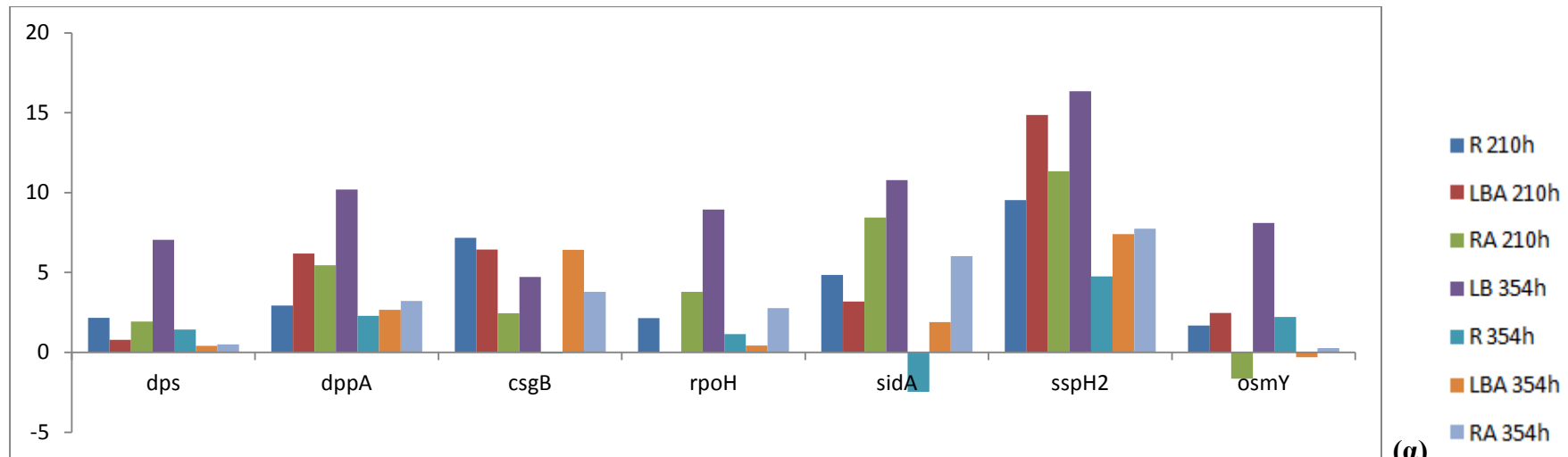


(α)

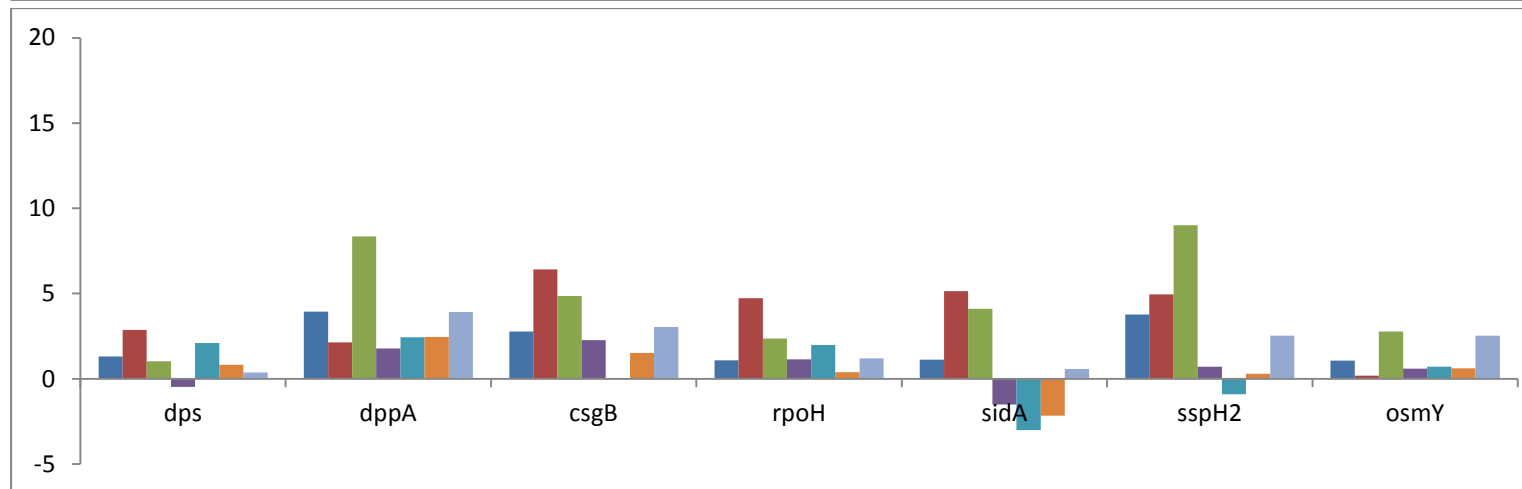


(β)

**Γράφημα 3.2.1** Σχετικό επίπεδο έκφρασης των γονιδίων στόχων του στελέχους *Salmonella enterica* serovar Typhimurium έπειτα από ανάπτυξη σε υγρό (LB) και στερεό (LBA) θρεπτικό υπόστρωμα LB, υγρό (R) και στερεό υπόστρωμα (RA) ρόκας στην επιφάνεια (tissue) και στην πλευρά των στοματίων φυτικού ιστού ρόκας (tissue S) στις 43 και 68 ώρες στους 20°C



(α)



(β)

**Γράφημα 3.2.2** Σχετικό επίπεδο έκφρασης των γονιδίων στόχων του στελέχους *Salmonella enterica* serovar Typhimurium έπειτα από ανάπτυξη σε υγρό (LB) και στερεό (LBA) θρεπτικό υπόστρωμα LB, υγρό (R) και στερεό υπόστρωμα (RA) ρόκας στις 210 και 354 ώρες στους 10°C.

## 4 Συζήτηση

### 4.1 Απαρίθμηση Μικροβιακού Πληθυσμού

Στην παράγραφο 3.1 παρουσιάστηκε σε γραφήματα η ανάπτυξη του στελέχους *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 έπειτα από εμβολιασμό αυτού σε διάφορα μέσα ανάπτυξης στους 20°C και στους 10°C. Τα μέσα ανάπτυξης αυτά ήταν το εργαστηριακό υπόστρωμα LB σε υγρή (Broth) και στερεή μορφή (LB Agar) σε μήτρα ανάπτυξης (gel cassette), εκχύλισμα ρόκας σε υγρή και στερεή μορφή και φυτικός ιστός ρόκας. Η απαρίθμηση του μικροβιακού πληθυσμού έδειξε διαφορές αναφορικά με τη μικροβιακή ανάπτυξη.

Αναφορικά με την αρχική μικροβιακή χλωρίδα του φυτικού ιστού, ο πληθυσμός έδειξε ότι η αερόβια μικροχλωρίδα (30°C) του φυτικού ιστού ήταν 6 log cfu/ml, ενώ τα εντεροβακτήρια (37°C) 5 log cfu/ml. Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με σχετική έρευνα που αφορά τον προσδιορισμό της μικροβιακής κατάστασης φρέσκων λαχανικών συμπεριλαμβανομένης και της ρόκας (Oliveira et al., 2011). Συγκρίνοντας το μικροβιακό φορτίο του φυτικού ιστού ρόκας που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο με το μικροβιακό φορτίο μαρουλιού διακρίνουμε πως το εύρος τιμών τόσο για την αερόβια μικροχλωρίδα όσο και για τα εντεροβακτήρια είναι παρόμοιο. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι σε δείγματα μαρουλιού το μικροβιακό φορτίο για αερόβια μικροχλωρίδα κυμαίνεται από 4 log cfu/ml έως 6 log cfu/ml ενώ αντιστοίχως για τα εντεροβακτήρια από 3 log cfu/ml έως 5 log cfu/ml (Oliveira et al., 2011; Aycicek et al., 2006).

Συγκρίνοντας την ανάπτυξη σε υγρό και στερεό εργαστηριακό θρεπτικό υπόστρωμα LB με αυτήν στο εκχύλισμα ρόκας σε υγρή και στερεή μορφή παρατηρείται διαφορά ενός λογαριθμού στα επίπεδα του πληθυσμού του μικροοργανισμού με τη μικρότερη ανάπτυξη να παρατηρείται στα δείγματα εκχυλίσματος ρόκας τόσο στους 20°C όσο και στους 10°C. Αυτή η διαφοροποίηση στα επίπεδα του πληθυσμού μπορεί να οφείλεται στην διαφορετική σύσταση θρεπτικών στοιχείων που έχει το κάθε μέσο ανάπτυξης. Είναι γνωστό πως ένα εργαστηριακό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης έχει καθορισμένη σύσταση σε θρεπτικά στοιχεία ώστε να ευνοηθεί η ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Αντιθέτως, σε ένα μέσο ανάπτυξης το οποίο έχει προκύψει από φυτικό ιστό η θρεπτική σύσταση δεν είναι γνωστή και καθορισμένη αφού η θρεπτική σύσταση ενός φυτικού ιστού εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως είναι η ηλικία και οι συνθήκες ανάπτυξης του στον αγρό. Επομένως, λόγω αυτής της

παραλλακτικότητας είναι αναμενόμενο η μικροβιακή ανάπτυξη στα φυτικά θρεπτικά μέσα να είναι πιο χαμηλή καθώς τα θρεπτικά στοιχεία μπορεί είναι περιορισμένα. Αναφορικά με τα δείγματα του φυτικού ιστού τα χαμηλά επίπεδα πληθυσμού του στελέχους *Salmonella enterica* serovar Typhimurium που παρατηρήθηκαν τόσο στους 20°C όσο και στους 10°C ενδεχομένως οφείλονται στον ανταγωνισμό για τα θρεπτικά συστατικά που υπήρξε μεταξύ της ενδογενούς μικροχλωρίδας και του εμβολιαζόμενου μικροοργανισμού. Αξίζει να σημειωθεί πως αυτές οι διαφορές είναι πιο έντονες επειδή σε κάθε επανάληψη του πειράματος γινόταν χρήση διαφορετικής παρτίδας ρόκας.

Στους 10°C παρατηρήθηκαν τα χαμηλότερα επίπεδα μικροβιακού πληθυσμού σε σύγκριση με τους 20°C. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση των 10°C γίνεται αντιληπτό πως η ανάπτυξη γινόταν με πολύ πιο αργούς ρυθμούς και ο πληθυσμός του μικροοργανισμού ήταν πιο χαμηλός συγκριτικά με τους 20°C λόγω επίδρασης χαμηλής θερμοκρασίας. Επιπρόσθετα, η ανάπτυξη του στελέχους *Salmonella Typhimurium* στα διάφορα μέσα ανάπτυξης επηρεάζεται από τη φυσιολογία του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα η ανάπτυξη του μικροοργανισμού υπό μορφή βιοϋμενικού ή πλαγκτονικού κυττάρου μπορεί να εξηγήσει τη διαφορά του μικροβιακού πληθυσμού μεταξύ της ανάπτυξης σε υγρό εργαστηριακό υπόστρωμα LB και εκχυλίσματος ρόκας με την ανάπτυξη σε στερεή μορφή των δύο αυτών υποστρωμάτων. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα από τον έλεγχο έκφρασης γονιδίων με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου και πιο συγκεκριμένα την έκφραση του γονιδίου *csgB* που σχετίζεται με την προσκόλληση (Γράφημα 3.2.1 και 3.2.2) τόσο στους 20°C όσο και στους 10°C γίνεται αντιληπτό ότι το συγκεκριμένο γονίδιο στην περίπτωση της ανάπτυξης σε στερεό υποστρώματα υπερεκφράστηκε. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να μας οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι στις συγκεκριμένες συνθήκες υπήρχε σχηματισμός βιοϋμενικών κυττάρων. Αντίστοιχα, κατά την ανάπτυξη σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα το γονίδιο *csgB* εκφράστηκε σε χαμηλότερο βαθμό ή ακόμα και υποεκφράστηκε γεγονός που υποδηλώνει ότι σε αυτή την περίπτωση δεν υπήρχε σχηματισμός βιοϋμενίου αλλά ελεύθερα κύτταρα αιωρούμενα μέσα σε υγρό (πλαγκτονικά κύτταρα).

Δεν υπάρχουν αρκετές διαθέσιμες πληροφορίες όσον αφορά την επίδραση της διαθεσιμότητας των θρεπτικών στοιχείων στην ανάπτυξη του παθογόνου *Salmonella* είτε βρίσκεται υπό μορφή βιοϋμενίου είτε υπό μορφή πλαγκτονικού κυττάρου. Από τα αποτελέσματα της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής παρατηρήθηκε ότι κατά την ανάπτυξη στους 20°C είτε στους 10°C ο μικροβιακός πληθυσμός ανήλθε σε υψηλότερα επίπεδα στην περίπτωση που επικρατούσε η πλαγκτονική μορφή του κυττάρου. Συγκεκριμένα, στην

περίπτωση των 20°C κατά μέσο όρο ο πληθυσμός, στο υγρό εργαστηριακό υπόστρωμα LB και εκχύλισμα ρόκας ήταν 9 log cfu/ml και 8 log cfu/ml αντίστοιχα, ενώ στο στερεό εργαστηριακό υπόστρωμα LB και εκχύλισμα ρόκας ήταν της τάξεως των 8 log cfu/cm<sup>2</sup> και 7 log cfu/cm<sup>2</sup>, αντίστοιχα. Όμοια εικόνα παρατηρείται και στην περίπτωση των 10°C με τους σχετικούς μικροβιακούς πληθυσμούς να είναι παρόμοιοι για τα υγρά θρεπτικά υποστρώματα και 7 και 6 log cfu/cm<sup>2</sup> στο στερεό εργαστηριακό υπόστρωμα LB και εκχύλισμα ρόκας, αντίστοιχα.

Τέλος, ένα άλλο ζήτημα το οποίο αξίζει να διερευνηθεί αναφορικά με την ανάπτυξη της *Salmonella Typhimurium* σε θρεπτικά μέσα ανάπτυξης που προέρχονται από φυτικό ιστό ρόκας είναι η χημική του σύσταση. Ο φυτικός ιστός της ρόκας είναι πλούσιος σε δευτερογενείς μεταβολίτες όπως είναι ταννίνες, τερπένια, αλκαλοειδή και φλαβονοειδή, σε γλυκοσινολικά οξέα (glucosinolates, GSLs) και σε ερουκικό οξύ. Επιστημονικά πειράματα με στόχο τη διερεύνηση των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του εκχυλίσματος της ρόκας από τα φύλλα της καθώς και του ελαίου που περιέχει ο σπόρος της έχουν καταγραφεί από τα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα. Συγκεκριμένα μια ομάδα ερευνητών (Abdou et al., 1972), ανακάλυψαν πως το εκχύλισμα της ρόκας και το έλαιο του σπόρου της έχει αντιμικροβιακή δράση έναντι των βακτηρίων *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* και *Bacillus subtilis*. Τα τελευταία χρόνια η αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος και του ελαίου του φυτού *Eruca sativa* έχουν απασχολήσει αρκετούς ερευνητές. Οι Gulfranz et al. (2011) υποστήριξαν την αντιμικροβιακή δράση του ελαίου από το σπόρο της ρόκας έναντι του βακτηρίου *E.coli* σε συγκέντρωση 50-72 µg/ml δημιουργώντας μια ζώνη αναστολής ακτίνας έως 30 mm. Ωστόσο, ενδιαφέρον προκαλεί η αντιμικροβιακή δράση αυτών και έναντι μυκήτων. Οι Rani et al. (2010) απέδειξαν την αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος ρόκας έναντι μυκήτων του γένους *Penicillium*.

Από τη βιβλιογραφία φαίνεται ότι η αντιμικροβιακή δράση που χαρακτηρίζει το φυτό *Eruca sativa* οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα του σε GSLs. Τα παράγωγα της υδρόλυσης των GSLs θεωρούνται ισχυροί και ικανοί αναστολείς της βακτηριακής δραστηριότητας. Οι ισοθειοκυανούχες ενώσεις που παράγονται από την υδρόλυση των GSLs είναι αυτές που θεωρείται ότι παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων. Μάλιστα, έχει καταγραφεί ότι οι αλκυλο-ισοθειοκυανούχες ενώσεις είναι κυτοτοξικές στο βακτήριο *Salmonella Typhimurium* (Tiendink et al., 1991). Η τοξικότητα και το εύρος της αντιμικροβιακής δράσης των ισοθειοκυανούχων ενώσεων ποικίλλει ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού, με τα Gram αρνητικά βακτήρια να είναι λιγότερο ευαίσθητα από ότι τα Gram θετικά βακτήρια (Adarsh et al., 2009). Υπάρχει διαθέσιμη βιβλιογραφία αναφορικά με

την αντιμικροβιακή δράση των GSLs αλλά ελάχιστες είναι οι πληροφορίες σχετικά με το μηχανισμό που κρύβεται πίσω από αυτή τη δράση. Ο Zsolnai (1966) υποστήριξε ότι τα προϊόντα υδρόλυσης των GSLs δρουν μέσω απενεργοποίησης διαφόρων ενδοκυτταρικών ενζύμων του παθογόνου βακτηρίου. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω οξειδωτικής διάσπασης των γεφύρων –S – S – που υπάρχουν στα ένζυμα. Μια άλλη θεωρία του μηχανισμού της αντιμικροβιακής δράσης θεωρείται η παρεμπόδιση της σύνθεσης ATP στα βακτηριακά κύτταρα μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια (Kojima and Oawa, 1971).

Συνεπώς, με βάση τα παραπάνω, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι αυτή η διαφορά της τάξεως του ενός λογαρίθμου που υπάρχει μεταξύ του εργαστηριακού θρεπτικού υποστρώματος LB και του εκχυλίσματος ρόκας μπορεί να οφείλεται και στην αντιμικροβιακή δράση των γλυκοσινολικών οξέων και των προϊόντων υδρόλυσης τους. Επίσης, η αντιμικροβιακή δράση αυτών των ενώσεων έπαιξε ρόλο και στη χαμηλή ανάπτυξη που παρουσίασε το παθογόνο όταν αναπτύχθηκε στον φυτικό ιστό.

## 4.2 Έλεγχος έκφρασης γονιδίων

Για τον έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων – στόχων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου και τα σχετικά αποτελέσματα φαίνονται στα Γραφήματα 3.2.1 και 3.2.2.. Η έκφραση των γονιδίων – στόχων εξετάστηκε σε κύτταρα του στελέχους *Salmonella Typhimurium* που συλλέχθηκαν έπειτα από ανάπτυξη σε διάφορα μέσα ανάπτυξης (πίνακας 2.1) στους 20°C και στους 10°C. Κρίνεται σκόπιμο να αναφερθεί για τους 10°C δεν ήταν δυνατή η παρακολούθηση της έκφρασης των γονιδίων στο φυτικό ιστό πιθανώς λόγω του χαμηλού μικροβιακού φορτίου που υπήρχε.

Αναφορικά με το γονίδιο *dps* του οποίου ο λειτουργικός ρόλος είναι η αντίδραση του μικροοργανισμού σε συνθήκες καταπόνησης και στέρησης θρεπτικών στοιχείων, στα στερεά θρεπτικά υποστρώματα παρατηρήθηκε υπερέκφραση του γονιδίου στους 20°C. Όμως, υπάρχει διαφορά στο πως αυτή εξελίχθηκε στις διαφορετικές ώρες δειγματοληψίας και στο διαφορετικό μέσο ανάπτυξης. Στην περίπτωση του στερεού εργαστηριακού υποστρώματος LB, στις 43 ώρες το σχετικό επίπεδο έκφρασης λαμβάνει μεγαλύτερη τιμή ενώ στις 68 ώρες η τιμή αυτή μειώνεται. Αντιθέτως, στην περίπτωση της μορφής στερεού εκχυλίσματος ρόκας το σχετικό επίπεδο έκφρασης στις 43 ώρες στη μια βιολογική επανάληψη υποεκφράζεται και



στη δεύτερη υπερεκφράζεται, ενώ στις 68 ώρες και στις δύο επαναλήψεις το γονίδιο φάνηκε να υπερεκφράζεται. Αυτή η παρατήρηση οδηγεί στο συμπέρασμα πως στο στερεό εκχύλισμα ρόκας ο μικροοργανισμός βρισκόταν σε συνθήκες καταπόνησης μέχρι το τέλος της ανάπτυξης (68 ώρες). Στους 10°C, στα στερεά θρεπτικά υποστρώματα παρατηρείται όμοια εικόνα με αυτή του στερεού εργαστηριακού υποστρώματος LB στους 20°C. Όσον αφορά την ανάπτυξη στο φυτικό ιστό στους 20°C το συγκεκριμένο γονίδιο υποεκφράστηκε εκτός από την πρώτη βιολογική επανάληψη στην περίπτωση εμβολιασμού στην πλευρά των στοματίων. Στο υγρό εργαστηριακό υπόστρωμα LB και εκχύλισμα ρόκας, στους 20°C παρατηρήθηκε υποέκφραση ή έκφραση σε σχετικά χαμηλά επίπεδα σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, ενώ στους 10°C παρατηρήθηκε υπερέκφραση του ίδιου γονιδίου. Πιθανώς αυτή η διαφοροποίηση να οφείλεται στην έλλειψη θρεπτικών συστατικών στα δύο μέσα ανάπτυξης έπειτα από ανάπτυξη του μικροοργανισμού για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Το γονίδιο *drpA* σχετίζεται με τη μεταφορά ολιγοπεπτιδίων μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και την προσαρμογή σε έλλειψη θρεπτικών συστατικών. Στους 20°C διαπιστώθηκε υποέκφραση του γονιδίου στο υγρό εκχύλισμα ρόκας. Στο στερεό εργαστηριακό υπόστρωμα LB στη μια βιολογική επανάληψη υπερεκφράστηκε, ενώ στη δεύτερη υποεκφράστηκε. Αντίθετα, στο στερεό εκχύλισμα ρόκας παρατηρήθηκε έκφραση του γονιδίου, εκτός από την περίπτωση της δεύτερης βιολογικής επανάληψης στις 68h. Στο φυτικό ιστό παρατηρήθηκε διακύμανση μεταξύ των αποτελεσμάτων, με τις περισσότερες περιπτώσεις το γονίδιο να υπερεκφράζεται. Αυτές οι διαφορές ενδεχομένως οφείλονται στην παραλλακτικότητα που παρουσιάζει ο φυτικός ιστός. Στο υγρό εργαστηριακό υπόστρωμα LB και εκχύλισμα ρόκας στους 10°C παρατηρείται υπερέκφραση του γονιδίου, φαινόμενο που έρχεται σε αντίθεση με τους 20°C. Τέλος, όσον αφορά το στερεό εργαστηριακό υπόστρωμα LB και το στερεό εκχύλισμα ρόκας στις 210 ώρες ανάπτυξης διαπιστώθηκε υπερέκφραση του γονιδίου η οποία όμως στις 354 ώρες μειώθηκε.

Ιδιαίτερης σημασίας χαρακτηρίζεται η έκφραση του γονιδίου *csgB* καθώς ο λειτουργικός του ρόλος σχετίζεται με την προσκόλληση του βακτηρίου και συνεπώς συνδέεται με την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου. Στους 20°C παρατηρείται υπερέκφραση του γονιδίου στο στερεό εργαστηριακό θρεπτικό υπόστρωμα LB και στο στερεό εκχύλισμα ρόκας καθόλη την ανάπτυξη του μικροοργανισμού γεγονός που σημαίνει ότι τα κύτταρα βρίσκονταν υπό μορφή βιοϋμενίου. Αντιθέτως, στο υγρό εκχύλισμα ρόκας διαπιστώθηκε υποέκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου γεγονός που σημαίνει πως σε αυτή την περίπτωση τα κύτταρα βρίσκονταν σε πλαγκτονική μορφή. Στο φυτικό ιστό στους 20°C είχαμε υπερέκφραση και στο φυτικό ιστό όπου ο εμβολιασμός είχε πραγματοποιηθεί από την

πλευρά των στοματίων το σχετικό επίπεδο έκφρασης του γονιδίου φαίνεται να λαμβάνει τιμές σχετικά μεγαλύτερες από ότι στο φυτικό ιστό όπου ο εμβολιασμός είχε γίνει από την επιφάνεια. Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία όπου θεωρείται πως η προσκόλληση και η είσοδος των βακτηρίων εντός της φυτικής επιφάνειας γίνεται μέσω των στοματίων. Τα αποτελέσματα των 20°C για τα μέσα ανάπτυξης στερεής και υγρής μορφής είναι σε ταύτιση με αυτά των 10°C.

Το γονίδιο *groH* σχετίζεται με την έλλειψη θρεπτικών στοιχείων (starvation). Στους 20°C παρατηρήθηκε υπερέκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου στα μέσα ανάπτυξης, με εξαίρεση την ανάπτυξη σε εκχύλισμα ρόκας στην πρώτη βιολογική επανάληψη. Στους 10°C, έκφραση του γονιδίου *groH* παρατηρήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις. Στο φυτικό ιστό παρατηρήθηκαν διακυμάνσεις καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις το γονίδιο υποεκφράστηκε ενώ σε δύο περιπτώσεις υπερεκράστηκε, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην παραλλακτικότητα που παρουσιάζει ο φυτικός ιστός.

Ένα άλλο γονίδιο του οποίου η έκφραση εξετάστηκε ήταν το *sidA*. Το συγκεκριμένο γονίδιο φαίνεται να σχετίζεται με τον έλεγχο της κυτταρικής διαίρεσης και την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων με μόρια – σήματα (quorum sensing). Στους 20°C διαπιστώθηκε υποέκφραση του γονιδίου στα υγρά εκχύλισμα ρόκας ενώ στο στερεό εργαστηριακό υπόστρωμα LB και στερεό εκχύλισμα ρόκας παρατηρήθηκε υπερέκφραση. Αυτό δικαιολογείται λαμβάνοντας υπόψη την ύπαρξη βιοϋμενικών κυττάρων στα μέσα ανάπτυξης στερεής μορφής που καθιστούν την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων αναγκαία (Williams, 2007). Στο φυτικό ιστό παρατηρήθηκε διακύμανση με μια περίπτωση το γονίδιο αυτό να υπερφράζεται και στις δύο βιολογικές επαναλήψεις. Στους 10°C η κατάσταση παρουσιάζεται διαφορετική. Στο εκχύλισμα ρόκας για τις 210 ώρες παρατηρείται υπερέκφραση του γονιδίου ενώ για τις 354 ώρες υποέκφραση. Υπερέκφραση του ίδιου γονιδίου παρατηρήθηκε στο στερεό εργαστηριακό υπόστρωμα LB και εκχύλισμα ρόκας, εκτός από την περίπτωση του στερεού εργαστηριακού υποστρώματος LB στις 354 ώρες που στη δεύτερη βιολογική επανάληψη παρατηρήθηκε υποέκφραση του γονιδίου..

Ένα άλλο γονίδιο του οποίου ελέγχθηκε η έκφραση στις συνθήκες αυτές ήταν το *sspH2* (πρωτεΐνη τελεστής) το οποίο επάγεται από το SPI2 (Salmonella Pathogenicity Island 2) και του οποίου η έκφραση σχετίζεται με την παθογένεια. Κατά την ανάπτυξη στους 20°C, στην πρώτη βιολογική επανάληψη το γονίδιο φάνηκε να υποεκφράζεται κατά την ανάπτυξη στο υγρό εκχύλισμα ρόκας, και σε ένα δείγμα φυτικού ιστού όπου εμβολιασμός είχε γίνει στην επιφάνεια ή στην πλευρά των στοματίων. Στη δεύτερη βιολογική επανάληψη, υποέκφραση του γονιδίου παρατηρήθηκε μόνο στην περίπτωση φυτικού ιστού που είχε εμβολιαστεί στην

πλευρά των στοματίων. Κατά την ανάπτυξη στους 10°C, σε όλες τις συνθήκες το γονίδιο αυτό φάνηκε να υπερκεφράζεται εκτός από την ανάπτυξη σε υγρό εκχύλισμα ρόκας στις 354h στην δεύτερη βιολογική επανάληψη.

Τελευταίο γονίδιο του οποίου η έκφραση διερευνήθηκε είναι το γονίδιο *osmY* το οποίο επάγεται από το οσμωτικό στρες. Το συγκεκριμένο γονίδιο στους 20°C υποεκφράστηκε στα περισσότερα μέσα ανάπτυξης, εκτός από το στερεό εργαστηριακό υπόστρωμα στην πρώτη βιολογική επανάληψη, και το στερεό εκχύλισμα ρόκας στις 68 και 43h στην πρώτη και δεύτερη βιολογική επανάληψη αντίστοιχα. Αντίστοιχα, στους 10°C παρατηρήθηκε ότι υπάρχει υποέκφραση του γονιδίου μόνο στην πρώτη βιολογική επανάληψη στην περίπτωση του στερεού εκχυλίσματος ρόκας και στερεού εργαστηριακού υποστρώματος στις 210h και στις 354 ώρες, αντίστοιχα. Στα υπόλοιπα μέσα ανάπτυξης παρατηρήθηκε υπερέκφραση του γονιδίου. Από αυτά τα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι στο εκχύλισμα ρόκας είτε σε υγρή είτε σε στερεή μορφή το κύτταρο υπέστη οσμωτικό στρες.

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται πως η γονιδιακή έκφραση σε ένα κύτταρο επηρεάζεται από τη φυσιολογία του, το μέσο ανάπτυξης αλλά και τις συνθήκες που επικρατούν. Από την παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή παρατηρείται αυτή η διαφορά στην έκφραση μεταξύ πλαγκτονικών και βιοϋμενικών κυττάρων. Παρόλα αυτά, στους 10°C δεν ήταν ξεκάθαρη αυτή η διαφοροποίηση αναφορικά με τη γονιδιακή έκφραση μεταξύ των πλαγκτονικών και βιοϋμενικών κυττάρων.

Στη βιβλιογραφία ελάχιστες είναι οι μελέτες που ως μέσο ανάπτυξης έχει χρησιμοποιηθεί εκχύλισμα από φυτικό ιστό. Αντιθέτως, αρκετές είναι οι έρευνες που έχουν χρησιμοποιήσει άλλες επιφάνειες που προσομοιάζουν την επιφάνεια του τροφίμου. Οι Giaouris et al. (2013) ασχολήθηκαν με τη διαφορετική έκφραση πρωτεϊνών μεταξύ πλαγκτονικών και βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4. Ο σχηματισμός βιοϋμενίου πραγματοποιήθηκε σε επιφάνεια ανοξειδωτου χάλυβα (coupons) στους 20°C για 144 ώρες. Από τα αποτελέσματα ταυτοποιήθηκαν 20 πρωτεΐνες που εκφράστηκαν μόνο στα βιοϋμενικά κύτταρα. Μεταξύ αυτών ήταν και το γονίδιο *drpA*, εύρημα που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των 20°C της παρούσας έρευνας.

Σε μια άλλη έρευνα εξετάστηκε η διαφορετική γονιδιακή έκφραση του μικροοργανισμού *Salmonella Typhimurium* SL1344 σε μορφή πλαγκτονικού και βιοϋμενικού κυττάρου (Hamilton et al., 2009). Ο σχηματισμός βιοϋμενίου έγινε σε επιφάνεια σιλικόνης στους 25°C για 72 ώρες. Για την ανάπτυξη κυττάρων πλαγκτονικής μορφής χρησιμοποιήθηκε BH Broth υπό τις ίδιες συνθήκες ανάπτυξης. Από το συγκεκριμένο πείραμα

βρέθηκε πως κατά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού πάνω σε επιφάνεια σιλικόνης επηρεάστηκε η έκφραση 124 πρωτεϊνών, με 59 από αυτές να υπερεκφράζονται και 65 από αυτές να υποεκφράζονται. Οι 24 πρωτεΐνες από τις υπερεκφραζόμενες βρέθηκε πως σχετίζονταν με την κινητικότητα του κυττάρου, με το μεταβολισμό των αμινοξέων και των υδατανθράκων καθώς και με άγνωστες μέχρι στιγμής λειτουργίες.

Σε μια παρόμοια έρευνα οι Mangallappalli – Plathu et al. (2008) μελέτησαν την ανάπτυξη και το σχηματισμό βιοϋμενίου από το μικροοργανισμό *Salmonella* Enteritidis ATCC4931 πάνω σε γυάλινες καλυπτρίδες. Ταυτοποιήθηκαν 32 πρωτεΐνες που παρουσίασαν διαφορετική έκφραση στη βιοϋμενική μορφή συγκριτικά με την πλαγκτονική (οι 14 υπερεκφράστηκαν και οι 18 υποεκφράστηκαν στα βιοϋμενικά κύτταρα). Οι υπερεκφραζόμενες πρωτεΐνες κυρίως σχετίζονταν με καταβολισμό συστατικών, με μετάφραση και τροποποίηση πρωτεϊνών, με τη σύνθεση του RNA και με τη μεταγραφή του DNA.

Μελέτες με στόχο τη διαφορετική γονιδιακή έκφραση μεταξύ πλαγκτονικών και βιοϋμενικών κυττάρων έχουν πραγματοποιηθεί και για το συγγενικό είδος *Escherichia coli*. Μια ομάδα ερευνητών (Trémoulet et al., 2002) ανακάλυψε πως έπειτα από σχηματισμό βιοϋμενίου του *E.coli* πάνω σε γυάλινους δίσκους (επώαση για 7 ημέρες στους 20°C) 14 γονίδια παρουσίασαν υπερέκφραση και 3 υποέκφραση στα βιοϋμενικά κύτταρα συγκριτικά με τα πλαγκτονικά. Επιπρόσθετα, οι Wick et al. (2001) ανακάλυψαν την υπερέκφραση του γονιδίου *drpA* σε συνθήκες όπου βιοϋμενικά κύτταρα *E.coli* στερούνταν τη γλυκόζη. Εύρημα το οποίο έρχεται σε ταύτιση με άλλες έρευνες (Hamilton et al., 2009; Giaouris et al., 2013) αλλά και με τα αποτελέσματα της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής.

Θα πρέπει να γίνει αντιληπτό όμως πως η άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων αυτών των ερευνών με τα αποτελέσματα της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής δεν είναι κατάλληλη καθώς διαφέρουν τα παρακάτω: στέλεχος αλλά και ορότυπος, μέσο και θερμοκρασία ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε μελέτη. Τέτοιες βιολογικές και τεχνικές διαφορές επιδρούν στη γονιδιακή έκφραση και καθιστούν περίπλοκη τη σύγκριση.

## 5 Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διατριβής, βρέθηκε να υπάρχει αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Salmonella enterica* serovar Typhimurium όταν αναπτύχθηκε σε εκχύλισμα ρόκας (υγρή και στερεή μορφή) και όταν αναπτύχθηκε απευθείας στο φυτικό ιστό στους 20°C και στους 10°C. Αυτή η αναστολή οφείλεται στη στέρηση θρεπτικών συστατικών στα συγκεκριμένα μέσα ανάπτυξης λόγω παραλλακτικότητας του φυτικού ιστού, στη φυσιολογία που παρουσιάζει το κύτταρο και στις αντιμικροβιακές ουσίες που περιέχει ο φυτικός ιστός της ρόκας. Από τον έλεγχο έκφρασης γονιδίων – στόχων βρέθηκε πως ήταν δυνατός ο σχηματισμός βιοϋμενίου στα θρεπτικά μέσα στερεής μήτρας ανάπτυξης, πως η είσοδος του μικροοργανισμού και η προσκόλληση του εντός της φυτικής επιφάνειας πραγματοποιήθηκε ισχυρότερα μέσω των στοματίων του φυτικού ιστού και πως στους 20°C στα δείγματα όπου κυριαρχούσε το βιοϋμένιο υπερεκφράστηκαν τα γονίδια που σχετίζονται με τη διαχείριση καταστάσεων καταπόνησης (γονίδια *dps*, *dppA*, *groH*, *sidA* και *ssrH2*). Τα αποτελέσματα της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης διευρύνουν τη γνώση σχετικά με τη φυσιολογία του παθογόνου *Salmonella* όταν βρίσκεται υπό μορφή βιοϋμενίου πάνω σε μια επιφάνεια που προσομοιάζει το πραγματικό τρόφιμο ή ακόμα και πάνω στο ίδιο το τρόφιμο (φυτικός ιστός). Απαιτείται περισσότερη έρευνα αναφορικά με την ανάπτυξη και τη γονιδιακή έκφραση των βιοϋμενικών κυττάρων έχοντας όμως υπόψη ότι τα βιοϋμένια αποτελούν μικροβιακές κοινότητες με υψηλή γενετική και φυσιολογική ετερογένεια ακόμα και όταν αναπτύσσονται κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Η δυνατότητα να γίνει αντιληπτό το γιατί και το πως το παθογόνο *Salmonella* προσκολλάται στις φυτικές επιφάνειες σχηματίζοντας βιοϋμένια είναι σημαντική καθώς με αυτό τον τρόπο θα δοθεί η δυνατότητα καλύτερης κατανόησης του φαινομένου με απώτερο σκοπό την εξάλειψη του συγκεκριμένου παθογόνου βακτηρίου από τα φρέσκα λαχανικά και τη μείωση των τροφιμογενών λοιμώξεων που αυτό προκαλεί.

## 6 Βιβλιογραφία

Abdou I. A., Abou – Zeid A. A., El Sherbeeney R. M., Abou – El – Gheat H. Z. (1972). Antimicrobial activities of *Allium sativum*, *Allium cepa*, *Raphanus sativus*, *Capsicum Frutescens*, *Eruca sativa* and *Allium kurrat* on bacteria. *Qual. Plant. Mater. Veg.*, 12(1), 29-35

Adarsh P. V., Geetanjali R., Tarunpreet S. T., Saroj A. (2009). Bio-protective effects of glucosinolates – A review. *Food Science and Technology*, 42, 1561-1572

Aruacsavage D., Lee K., Miller S., LeJeune T.J. (2006). Interactions affecting the proliferation and control of human pathogens on edible plants. *Journal of Food Science*, 71, 89-99

Aycicek H., Oguz U., Karci K. (2006). Determination of total aerobic and indicator bacteria on some raw eaten vegetables from wholesalers in Ankara, Turkey. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 209, 197-201

Beattie, G. A., Lindow, S. E. (1999). Bacterial colonization of leaves: A spectrum of strategies. *Phytopathology*, 89, 353-359

Beattie G.A. (2002). Leaf surface waxes and the process of leaf colonization by microorganisms. *Phyllosphere microbiology*, 3-26, APS Press

Berger C. N., Sodha, V. S. Shaw R. K., Griffin P. M., Pink D., Hand P., Frankel G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*, 12(9), 2385-2397

Bernstein N., Sela S., Neder-Lavon S.(2007). Assessment of contamination potential of lettuce by *Salmonella enterica* serovar Newport added to the plant growing medium. *Journal of Food Protection*, 70(7), 1717-1722

Beuchat L. R. (1996). Pathogenic microorganisms associated with fresh produce, *Journal of Food Protection*, 59; 204-216

Beuchat L. R. (1998). Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. *Center for Food Safety and Quality Enhancement*, University of Georgia USA

- Beuchat L. R. (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*, 4, 413-423
- Brandl T. M.(2006). Fitness of Human Enteric Pathogens on Plants and Implications for Food Safety. *Annual Review of Phytopathology*, 44:367–392
- Brenner W. F., Villar G. R., Angulo J. F., Tauxe R., Swaminathan B. (2000). *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), 2465-2467
- Brocklehurst,T.F., Mitchell,G.A., Smith,A.C, (1997). A model experimental gel surface for the growth of bacteria on foods. *Food Microbiology*, 14, 303-311
- Carmichael I., Hasper S. I., Coventry J.M., Taylor J. W. P., Wan J., Hickey W. (1999). Bacterial colonization and biofilm development on minimally processed vegetables. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 45-51
- Cox J., Hammack T. S., Andrews W. H. (1999). *Salmonella*. Encyclopedia of Food Microbiology, 3, 1928-1947, Academic Press
- Deering J. A., Mauer J. L., Pruitt E. R. (2012). Internalization of *E.coli* O157:H7 and *Salmonella spp.* In plants:A review. *Food Research International*, 45, 567-575
- EFSA-ECDC (2011). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *The EFSA Journal*, 9(3), 2090
- Fahey, J.W., Stephenson, K.K. (1999). Cancer chemoprotective of cruciferous vegetables. *HortScience*, 34, 1159-1163
- Fahey, J.W., Zalcmann, A.T., Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56, 5-51
- Fett F. W. (2000). Naturally occurring biofilms on alfalfa and other types sprouts. *Journal of Food Protection*, 63, 625-632
- Franz E., Visser A. A., Diepeningen A. D., Klerks M. M., Termoshuizen . J., Van Bruggen A. H. (2007). Quantification of contamination of lettuce by GFP-expressing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Food Microbiology*, 24(1), 106-112

- Giaouris E., Samoilis G., Chorianopoulos N., Ercolini D., Nychas J. G. (2013). Differential protein expression patterns between planktonic and biofilm cells of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 on stainless steel surface. *International Journal of Food Microbiology*, 162, 105-113
- Gulfraz M., Sadiq A., Tariq A., Tariq H., Imran M., Qureshi R., Zeenat A. (2011). Phytochemical Analysis and Antibacterial activity of *Eruca sativa* seed. *Pakistan Journal of Botany*, 43(2), 1351–1359
- Hamilton S., Bongaerts R. J., Mulholland F., Cochrane B., Porter J. Lucchini S., Lappin-Scott H. M., Hinton CD. J. (2009). The transcriptional programme of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a key role of tryptophan metabolism in biofilms. *BMC Genomics*, 10, 599
- Holst, B., Williamson, G. (2004). A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. *Natural Product Reports*, 21, 425-447
- Howard M. B., Hutcheson S. W. (2003). Growth dynamics *Salmonella enterica* strains on alfalfa sprouts and in waste seed irrigation water. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 548-553
- Hu L., Kopecko D. J. (2003). Typhoid *Salmonella*. International handbook of foodborne pathogens, 151-165, Marcel Dekker Inc., New York
- Kado C. I. (2009). Horizontal gene transfer: Sustaining pathogenicity and optimizing host-pathogen interactions. *Molecular Plant Pathology*, 10(1), 143-150
- Keck, A.S., Finley, J.W. (2004). Cruciferous vegetables: cancer protective mechanisms of glucosinolate hydrolysis products and selenium. *Integrative Cancer Therapies*, 3, 5-12
- Kojima M., Oawa K. (1971). Studies on the effect of isothiocyanates and their analogues on microorganisms. (I) Effects of isothiocyanates on the oxygen uptake of yeasts. *Journal of Fermentation Technology*, 49, 740-746
- Kunze D.J., Loneragan G.H., Platt T.M., Miller M.F., Besser T.E., Thomas E., Mohammad, Mindy M. (2008). *Salmonella enterica* burden in harvest - Ready cattle populations from the Southern high plains of the United States. *Environmental Microbiology*, 74, 345-351



- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , *Methods*, 25, 402-408
- Lovell H. C., Mansfield J. W., Godfrey S. A., Jackson R. W., Hancock J. T., Arnold D. L. (2009). Bacterial evolution by genomic island transfer occurs via DNA transformation *in planta*. *Current Biology*, 19(18), 1586-1590
- Mangalappalli – Illathu A.K., Lawrence J. R., Swerhone G. D., Korber D. R. (2008). Architectural adaptation and protein expression patterns of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis biofilms under laminar flow conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 109-120
- Marcus L. S., Brumell H. J., Pfeifer G. C., Finley B. B. (2000). *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and Infection*, 2, 145-156
- Martinez-Sanchez, A., Marin, A., Llorach, R., Ferrers, F., Gil, M.I. (2006). Controlled atmosphere preserve quality and antioxidant constituents in wild rocket (*Diplotaxis tenuifolia* L.) *Postharvest Biology and Technology*, 40, 26-33
- Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McVaig L.F., Bresee J.S., Shapiro C., Griffin P.M., Tauxe R.V. (1999). Food related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5, 607-625
- Norwood E. D., Gilmour A. (2000). The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 512-520
- Olaimat A., Holley R. (2012). Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. *Food Microbiology*, 32, 1-19
- Oliveira A. M., Maciel de Souza V., Bergamini M. M. A., Pereira de Martinis C. E. (2011). Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. *Food Control*, 22, 1400-1403
- Preston G. M. (2007). Metropolitan microbes: Type III secretion in multihost symbionts. *Cell Host & Microbe*, 2(5), 291-294

Pui, C. F., <sup>1</sup>Wong, W. C., Chai, L. C., Tunung, R., Jeyaletchumi, P., Noor Hidayah, M. S., Ubong, A., <sup>1</sup>Farinazleen, M. G., <sup>2</sup>Cheah, Y. K.\*Son, R. (2011). *Salmonella*: A foodborne pathogen. *International Food Research Journal*, 18, 465-473

Ramos B., Miller, F.A., Brandão T.R.S., Teixeira P., Silva C.L.M. (2013). Fresh fruits and vegetables - An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 1-15

Rani I., Akhund S., Suhail M.m Abro H. (2010). Antimicrobial potential of seed extract of *Eruca sativa*. *Pakistan Journal of Botany*, 42(4), 2949-2953

Robinson R. K. (1993). *Salmonella*. Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition, 6, 3981-3991, Eds. Macrae R., Robinson R. K. and Sadler M. J., Academic Press

Schikora A., Carreri A., Charpentier E., Hirt H. (2008). The dark side of the salad: *Salmonella typhimurium* overcomes the innate immune response of *Arabidopsis thaliana* and shows an enteropathogenic lifestyle. *PLoS One*, 3(5), e2279

Solomon E. B., Matthews K. R. (2005). Use of fluorescent microspheres as a tool to investigate bacterial interactions with growing plants. *Journal of Food Protection*, 68(4), 870-873

Tiedink H. G. M., Malingre C. E., van Broekhoven L. W., Jongen W. M., Lewis J., Fenwick G. R. (1991). Role of glucosinolates in the formation of N-nitroso compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 922-926

Tobe T., Beatson S. A., Taniguchi H., Abe H., Bailey C.M, Fivian A. (2006). An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103(40), 14941-14946

Trémoulet F., Duché O., Namane A., Martinie B., Labadie J. C. (2002). A proteomic study of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 cultivated in biofilm or in planktonic growth mode. *FEMS Microbiology Letters*, 215, 7-14

- Warriner K., Spaniolas S., Dickinson M., Wright C., Waites W. M. (2003). Internalization of bioluminescent *Escherichia coli* and *Salmonella* Montevideo in growing bean sprouts. *Journal of Applied Microbiology*, 95(4), 719-727
- Wells J.M., Butterfield J.E. (1997). *Salmonella* contamination associated with bacterial soft rot of fresh fruits and vegetables in the marketplace, *Plant Disease*, 81, 867–872
- Wick L. M., Quadroni M., Egli T. (2001). Short- and long- term changes in proteome composition and kinetic properties in a culture of *Escherichia coli* during transition from glucose-excess to glucose-limited growth conditions in continuous culture and vice versa. *Environmental Microbiology*, 3, 588-599
- Williams P. (2007). Quorum sensing, communication and cross-kingdom signaling in the bacterial world. *Microbiology*, 153, 3923-3938
- Wilson M., Lindow S.E., (1994). Co existence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. *Applied Environmental Microbiology*, 60(12), 4468–4477
- Wilson M. (2001). Bacterial biofilms and human disease. *Science Progress*, 84(3), 235-254
- Yip C. K., Strynadka N. C. J. (2006). New structural insights into the bacterial type III secretion system. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(4), 223-230
- Yoo J. S., Jung Y. J., Chung S. Y., Lee Y. C., Choi Y. L. (2004). Molecular cloning and characterization of CMCCase gene (celC) from *Salmonella typhimurium* UR. *Journal of Microbiology*, 42(3), 205-210
- Zsolnai T. (1966). Antimicrobial effect of thiocyanates and isothiocyanates. *Arztliche Forschung*, 16, 870-876