

ΠΜΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Μελέτη οριακών συνθηκών οξεοανθεκτικότητας του
παθογόνου *Listeria monocytogenes*

Πρίντζη Αντωνία Ν.

Μεταπτυχιακή Μελέτη

Επιβλέπων : Σκανδάμης Παναγιώτης

Αθήνα 2013

Μεταπτυχιακή Μελέτη

Μελέτη οριακών συνθηκών οξεοανθεκτικότητας του
παθογόνου *Listeria monocytogenes*

Πρίντεζη Αντωνία Ν.

: Σκανδάμης Παναγιώτη

: Δροσινός Ελευθέριος, Καθηγητής

Σκανδάμης Παναγιώτης, Επίκουρος
Καθηγητής

Τσακαλίδου Ευθυμία, Καθηγήτρια

Abstract

This study aims to explore how factors such as the microstructure, storage temperature and growth boundary conditions (pH-NaCl) affect a) the growth of two strains of *Listeria monocytogenes* of different serotype and b) the survival under lethal acidic stress (pH 2).

The study begins with an evaluation of how the microstructure of the growth medium affects two strains of *Listeria monocytogenes* at 4° C and 10° C, as well as the resistance of those strains towards subsequent acid challenge. The aim was to study how the microstructure of the solid and liquid media and depth (as a limiting factor for diffusion of products) affect the growth of *Listeria monocytogenes*, and how the microorganism respond towards subsequent acidic stress. Gelatin was used as the solidification agent. Regarding the microstructure, a comparison of the test results shows that the only difference was in the development between liquid and solid media where throughout the duration of the storage it was about 1 log CFU / ml, a difference that is eliminated in the end of storage. Regarding the resistance under acidic conditions, a survival at 10° C was observed when most cells were at stationary phase.

Furthermore, the study estimates the effect of the boundary growth conditions (pH-NaCl) at 7°C of two strains of *Listeria monocytogenes* on surviving after subjection to lethal acidic conditions. Regarding the ability of the two strains to grow under these conditions, results showed only pH >5.5 and NaCl <4% w/V are growth permitting, while extreme combinations of pH-NaCl resulted in a multivariable behavior. Moreover, their response to subsequent lethal acidic stress, both strains showed identical behavior. Specifically, storage conditions of pH 5,5-6,4 and NaCl 2-4% resulted in higher survival during storage, in contrast to growth limiting pH (4,8-5,0) and NaCl (8-10%) combinations that resulted in no survival of the microorganism. Finally, study of the molecular mechanisms, induced during storage, revealed an upregulation of the relative transcription of stress and virulence-related genes, that could shed light in the subsequent response of *L. monocytogenes* towards lethal acid stress.

Περίληψη

Η παρούσα μελέτη διερευνά πώς παράγοντες όπως η μικροδομή του θρεπτικού υποστρώματος, η θερμοκρασία συντήρησης καθώς και οριακές συνθήκες (pH-NaCl) επιδρούν α) στην ανάπτυξη δύο στελεχών διαφορετικού ορότυπου της *Listeria monocytogenes* και β) στην επιβίωση του έναντι ακόλουθης όξινης καταπόνησης.

Αρχικά εκτιμήθηκε η επίδραση της μικροδομής του μέσου ανάπτυξης και η ανθεκτικότητα κατά την όξινη καταπόνηση σε δύο στελέχη του *Listeria monocytogenes* σε 4° C και 10° C. Σκοπός ήταν να μελετηθεί πως επηρεάζει η μικροδομή του υποστρώματος (στερεό, υγρό) και το βάθος ανάπτυξης, ως περιοριστικός παράγοντας για την διάχυση προϊόντων, την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes*, αλλά και η συμπεριφορά της έναντι όξινων συνθηκών καταπόνησης. Ως παράγοντας στερεοποίησης χρησιμοποιήθηκε η ζελατίνη. Από την σύγκριση των αποτελεσμάτων, ως προς την μικροδομή προκύπτει ότι η μόνη διαφορά που υπήρξε κατά την ανάπτυξη ήταν μεταξύ των υγρών και των στερεών υποστρωμάτων όπου καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης ήταν περίπου 1 log CFU/ml, μια διαφορά που εξισώνεται στο τέλος της συντήρησης. Ενώ σε συνθήκες όξινης καταπόνησης παρατηρήθηκε επιβίωση στους 10° C όταν τα κύτταρα πλέον βρίσκονταν στην στατική τους φάση.

Στην συνέχεια εκτιμήθηκε πώς επηρεάζουν οι οριακές συνθήκες ανάπτυξης (pH-NaCl) σε θερμοκρασία 7° C δύο διαφορετικά στελέχη *Listeria monocytogenes*, στη μετέπειτα επιβίωση-μη επιβίωση ακραίας όξινης καταπόνησης. Όσον αφορά στην εκτίμηση των οριακών συνθηκών ανάπτυξης παρατηρήθηκε αύξηση και για του δύο ορότυπους κοντά στις βέλτιστες τιμές pH και χαμηλές συγκεντρώσεις NaCl, ενώ παραλλακτικότητα παρατηρήθηκε για ακραίους συνδυασμού pH-NaCl. Όσον αφορά την απόκριση σε όξινη καταπόνηση, τα δύο στελέχη παρουσίασαν πανομοιότυπη συμπεριφορά. Πιο συγκεκριμένα συνθήκες συντήρησης pH 5,5-6,4 και NaCl 2-4% είχαν ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη επιβίωση κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Αντίθετα, ακραίοι συνδυασμοί pH (4,8-5,0) και NaCl (8-10%) οδήγησαν στην πλήρη θανάτωση του μικροοργανισμού μετά από έκθεση σε συνθήκες όξινης

καταπόνησης. Τέλος μοριακή προσέγγιση της φυσιολογικής απόκρισης του παθογόνου σε οριακές για την ανάπτυξη συνθήκες κατέδειξε μεταβολή της σχετικής έκφρασης γονιδίων σχετικών με την απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης καθώς και γονιδίων παθογένειας, κατά τη διάρκεια της συντήρησης.

Whatever you do, pour yourself into it

Robert Mondavi

μ

1.1	Ιστορικά Στοιχεία	10
1.2	Ταξινόμηση	10
1.3	Ο μικροοργανισμός και τα χαρακτηριστικά του	12
1.4	Ευρωπαϊκός Κανονισμός	14
1.5	Χαρακτηριστικά ανάπτυξης και επιβίωσης στα τρόφιμα	14
1.6	Λιστερίωση και κρούσματα	16
1.7	19
1.8	19
1.9	μ	23
1.10	pH στη <i>Listeria monocytogenes</i>	23
1.11	25
1.12	NaCl <i>Listeria monocytogenes</i>	26
1.13	μ <i>Listeria monocytogenes</i>	27
1.14	<i>Listeria monocytogenes</i> ().....	29
1.15	μ	34
1.16	36
1.17	μ - μ μ	38
1.18	μ μ μ μ	39
1.19	40
1.19.1	μ	40
1.19.2	41
2.	43
2.1	μ μ	43
2.2	μ μ	43
2.3	μ	44
2.4	45
2.5	45
2.6	μ	46
2.6.1	μ	46
2.6.2	μ	46
2.6.3	Gram	47
2.7	μ μ μ <i>Listeria monocytogenes</i>	48
2.7.1	μ	49
2.7.2	μ μ	49
2.7.3	μ	50
2.7.4	μ	50
2.7.5	μ	51
2.8	μ <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	53
2.8.1	53
2.8.2	53
2.8.3	μ	54

2.8.4					54
2.8.5	μ		RNA		55
2.8.6.					
PCR)			μ	μ	(Real time
3.	μ				56
3.1		μ	μ	μ	58
			<i>Listeria monocytogenes</i>		58
3.1.1		μ	μ	μ	μ
			<i>Listeria monocytogenes</i>		59
3.1.2		μ	μ	μ	
μ			<i>Listeria monocytogenes</i>		
					62
3.2	μ				<i>Listeria</i>
<i>monocytogenes</i>					69
3.2.1		pH-NaCl			<i>Listeria monocytogenes</i>
3.2.2					<i>Listeria monocytogenes</i>
					73
3.2.3	μ			gad2, sigB	prfA
					77
4.					82

1.1 Ιστορικά Στοιχεία

Ο *Listeria monocytogenes* είναι ένας από τους πιο μελετημένους μικροοργανισμούς των τελευταίων 25 ετών. Αν και είχε γίνει αναφορά στο μικροοργανισμό από το 1891, πρώτος ο *Murray* περιέγραψε αυτό το μικροοργανισμό ως αιτία ζωικής ασθένειας το 1926. Λόγω του ότι το παθογόνο προσέβαλλε τα λευκοκύτταρα και προκάλούσε μονοκύτωση ως ένα από τα συμπτώματα, έλαβε την ονομασία *Bacterium monocytogenes*, η οποία στην πορεία άλλαξε σε *Listerella monocytogenes* προς τιμή του Λόρδου Lister. Η ονομασία *Listeria monocytogenes* έγινε αποδεκτή τελικά το 1940, ενώ η πρώτη απομόνωση στελέχους του *Listeria* έγινε το 1929. Εντούτοις, το ενδιαφέρον για αυτόν τον οργανισμό αυξήθηκε γρήγορα μετά από μια σειρά τροφικών κρουσμάτων κατά τη δεκαετία του '80, οι οποίες παρουσίαζαν υψηλό ποσοστό θνησιμότητας. Μέχρι σήμερα, τεράστια ποσά γνώσης έχουν συλλεχθεί στον τομέα της λιστερίωσης αλλά και για τον ίδιο το μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes* (*Lovett, 1989; Farber και Peterkin, 1991; Roccourt και Cossart, 1997; Schlech III, 2000*).

1.2 Ταξινόμηση

Για πολλά χρόνια ο *L. monocytogenes* θεωρείτο ότι ανήκε στην οικογένεια *Corynebacteriaceae*. Με την πάροδο των χρόνων και σύμφωνα με νέα δεδομένα, οι επιστήμονες διαπίστωσαν κοινά χαρακτηριστικά του με τα γένη *Lactobacillus*, *Erysipelothrix* και *Brothothrix*. Για το λόγο αυτό, η σημερινή ταξινόμηση του είδους θεωρείται η παρακάτω:

- Βασίλειο: Bacteria
- Φύλο: Firmicutes
- Κλάση: Bacilli
- Τάξη: Bacillales
- Οικογένεια: Listeriaceae
- Γένος: Listeria

Πλέον πιστεύεται ότι το γένος *Listeria* είναι στενά συνδεδεμένο με το γένος *Brothothrix*. Τα δύο αυτά γένη κατέχουν θέση μεταξύ των γενών *Lactobacillus* και *Bacillus* και είναι λιγότερο συνδεδεμένα με τα γένη *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Kurthia*, *Gemella* και *Erysipelothrix*. (*Farber and Peterkin, 1991*).

Το γένος *Listeria* περιλαμβάνει κινητικά, μη-σπορογόνα, μη έγκλειστα, Gram-θετικά, σχήματος κοκο -βακίλλου βακτήρια (*Seeliger και Jones, 1986*). Το μέγεθος τους κυμαίνεται από 0,4 έως 0,5 μm πλάτος και 0,5 - 2,0 μm μήκος (*Seeliger και Jones, 1986*). Επί του παρόντος επτά είδη αναγνωρίζονται τα οποία είναι τα εξής: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. ivanovii* και *L. marthii* (*Boerlin et al, 1992*; *Seeliger και Jones, 1986*; *Graves et al, 2009*). Ο *Listeria ivanovii* χωρίζεται περαιτέρω σε δύο υποείδη: *ivanovii*, και *londoniensis* (*Boerlin et al, 1992*). Δύο από τα είδη (*L. monocytogenes* και *L. ivanovii*) είναι παθογόνα. Ο *Listeria monocytogenes* είναι ένα τροφιμογενές ανθρώπινο παθογόνο που ευθύνεται για τη λιστερίωση, ενώ ο *Listeria ivanovii* είναι ένα ζωικό παθογόνο, που προσβάλλει κυρίως πρόβατα και βοοειδή (*Murray et al, 1926*; *Seeliger et al, 1984*). Το είδος *L. monocytogenes* περιέχει 13 διαφορετικούς ορότυπους: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a,4c 4b, 4d, και 4e.

1.3 Ο μικροοργανισμός και τα χαρακτηριστικά του

Ο *Listeria monocytogenes* όπως αναφέρθηκε είναι ένα Gram-θετικό, προαιρετικά-αναερόβια, ραβδόμορφο βακτηρίδιο. Η κίνηση του επιτιγχάνεται μέσω μαστιγίων. Δε σχηματίζει σπόρια και είναι κυρίως ευκίνητο σε θερμοκρασία δωματίου. Επίσης είναι θετικό στην αντίδραση καταλάσης, ενώ αρνητικό στην αντίδραση της οξειδάσης. Περιστασιακά, έχουν βρεθεί αρνητικά στην καταλάση στελέχη που έχουν απομονωθεί από κλινικά δείγματα (Bubert et al, 1997; Swartz et al, 1991).

Ο *Listeria monocytogenes* είναι ένα ευρέως διαδεδομένο σαπροφυτικό βακτήριο ικανό να προκαλέσει σοβαρή ασθένεια σε ανθρώπους. Ο μικροοργανισμός έχει αναγνωριστεί εδώ και 84 χρόνια, γνωστός ως ανθρώπινο παθογόνο που προκαλεί τη λοίμωξη λιστερίωση και επιβεβαιώθηκε πριν από 30 χρόνια (Murray et al, 1926; Schlech et al, 1983).

Η έρευνα όσον αφορά στη *Listeria* έχει οδηγήσει σε πολλά θετικά αποτελέσματα για την δημόσια υγεία, περιλαμβανομένης της προληπτικής ιατρικής, βελτιωμένες στρατηγικές διατήρησης των τροφίμων, καθώς και περιορισμένο έλεγχο στο περιβάλλον ενός εργοστασίου τροφίμων. Ωστόσο, η πρόσφατη αύξηση των δημοσιευμένων κρουσμάτων για λιστερίωση στην Αυστραλία και στις Ηνωμένες Πολιτείες (ΗΠΑ), με ένα ποσοστό θνησιμότητας έως και 30%, καθώς και οι οικονομικές επιπτώσεις για τη βιομηχανία τροφίμων από τις ανακλήσεις προϊόντων, δείχνουν ότι πολύ περισσότερη έρευνα είναι απαραίτητη. Μη επεμβατική μορφή (non-invasive) του μπορεί να προκαλέσει γαστρεντερίτιδα σε οποιονδήποτε. Συμπτώματα περιλαμβάνουν εμετό, ναυτία, κράμπες στο στομάχι και διάρροια. Η επεμβατική μορφή του *L. monocytogenes* μπορεί να προκαλέσει μία δυνητικά θανατηφόρα ασθένεια που προσβάλλει κυρίως ανθρώπους που είναι ανοσοκατασταλμένοι. Σε αυτούς τους ανθρώπους μπορεί να μολύνει το νευρικό σύστημα, προκαλώντας συμπτώματα γρίπης, εξελίσσεται σε μηνιγγίτιδα που μπορεί να προκαλέσει σπασμούς ή να επηρεάσουν άλλες κινητικές λειτουργίες (Farber και Peterkin, 1991). Σε εγκύους μπορεί να διασχίσει επίσης το φραγμό του πλακούντα (Lecuit, 2005). Ο

μικροοργανισμός μπορεί να προκαλέσει τόσο πυρετό και συμπτώματα γρίπης στη μητέρα όσο και πρόωρη θνησιγένεια για το έμβρυο. Τα νεογέννητα μωρά μπορούν να μολυνθούν από λιστερίωση από τις μητέρες τους στη μήτρα, η οποία μπορεί να προκαλέσει σηψαιμία ή και μηνιγγίτιδα.

Επιπλέον, η ικανότητα της *Listeria monocytogenes* να αναπτύσσεται τόσο σε χαμηλές θερμοκρασίες μεταφοράς ή αποθήκευσης τροφίμων (Harwig et al, 1991), αλλά και να επιζεί σε αρκετά υψηλές θερμοκρασίες (περίπου 50 °C, Doyle et al, 1987) για σύντομες χρονικές περιόδου, αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα, ειδικά όσον αφορά στα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα. Ειδικότερα, η αλληλεπίδραση μεταξύ της *L. monocytogenes* και του περιβάλλοντος, και πώς αυτή μπορεί να επηρεάσει την παθογένειά της, την ανθεκτικότητά και την ανεκτικότητά της σε συνθήκες καταπόνησης (στρες), έχει σημασία τόσο για τη βιομηχανία τροφίμων όσο και τη δημόσια υγεία. Η κατανόηση των πηγών, της διασποράς και των ορίων ανάπτυξης του *L. monocytogenes* έχει αποτελέσει τη βάση για τις παρεμβάσεις και τα προληπτικά μέτρα που πρέπει να ληφθούν ενάντια της λιστερίωσης (Chasseignaux et al, 2002; Crepet et al, 2007; Fenlon et al, 2008; Tienungoon et al., 2000). Μελέτες με στόχο την κατανόηση των φυσικών και βιολογικών παραγόντων που συμβάλλουν στην κατανομή της ασθένειας όσο και του οργανισμού είναι περιοχές ενεργούς έρευνας στη *L. monocytogenes* (Gray et al, 2004; Gray et al, 2006; Nightingale et al, 2004; O'Toole, 2004; Toledo - Arana et al, 2009). Ενώ η γνώση της οικοφυσιολογίας του *L. monocytogenes* αυξάνεται, πολλά μένουν ακόμη να καθοριστούν. Πιο ολοκληρωμένες γνώσεις σχετικά με τις φυσικές και βιολογικές παραμέτρους που συμβάλλουν στην ανάπτυξη και την επιβίωση του μικροοργανισμού αυτού είναι απαραίτητη, και θα μπορούσε να διευκολύνει την πρόβλεψη της κλινικής εμφάνισης της λιστερίωσης, ώστε να περιοριστεί η ανθρώπινη έκθεση, και να παραχθούν στρατηγικές για την πρόληψη της μόλυνσης των τροφών και συνακόλουθες λοιμώξεις. Η λιστερίωση είναι μία από τις κύριες αιτίες θανάτου μεταξύ των τροφιμογενών παθογόνων βακτηρίων, με τα ποσοστά θνησιμότητας να υπερβαίνουν ακόμη άλλων τροφιμογενών παθογόνων όπως *Salmonella* και *Clostridium botulinum*.

1.4 Ευρωπαϊκός Κανονισμός

Στην Ευρώπη, ο Ευρωπαϊκός Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 καθιερώνει μικροβιολογικά κριτήρια σε τρόφιμα. Για τον *L. monocytogenes* στην κατηγορία των έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων τα οποία επιτρέπουν την ανάπτυξή του, (εκτός εκείνων που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς), έχουν δύο διαφορετικά μικροβιολογικά κριτήρια (i) τα επίπεδα του *L. monocytogenes* θα πρέπει να είναι <100 CFU / g καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του προϊόντος, (ii) απουσία στα 25 g του προϊόντος πριν το τρόφιμο απομακρυνθεί από τον άμεσο έλεγχο του υπευθύνου της επιχείρησης τροφίμων, ο οποίος το έχει παράγει. Επίσης σε τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση μη ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη του *L. monocytogenes* διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς έχουν όριο 100 CFU / g. Η εφαρμογή είτε του πρώτου είτε του δεύτερου κριτηρίου εξαρτάται από το αν ο κατασκευαστής είναι σε θέση να αποδείξει ότι το επίπεδο του *L. monocytogenes* στο προϊόν του δεν θα υπερβαίνει τα 100 CFU / g σε όλη την διάρκεια ζωής του στο ράφι. Η απόδειξη αυτή πρέπει να βασίζεται στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του προϊόντος με τη διαβούλευση της επιστημονικής βιβλιογραφίας, όταν είναι απαραίτητο, ή μέσω ποσοτικών μοντέλων ή δοκιμών προσομοιώσεων.

1.5 Χαρακτηριστικά ανάπτυξης και επιβίωσης στα τρόφιμα

Η κατανόηση των παραγόντων που επηρεάζουν θετικά ή αρνητικά την ικανότητα του *L. monocytogenes* να επιβιώνει και να αναπτύσσεται στα τρόφιμα και σε περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων, είναι απαραίτητη στην ανάπτυξη και διαχείριση αποτελεσματικών μέτρων ελέγχου του.

Η ανάπτυξη και η επιβίωση του *L. monocytogenes* στα τρόφιμα εξαρτάται από τα ενδογενή (pH, aw) και τα εξωγενή (θερμοκρασία συντήρησης, σχετική υγρασία) χαρακτηριστικά του προϊόντος καθώς και τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται κατά την παραγωγική του διαδικασία (θερμική επεξεργασία). Μεγαλύτερη επιρροή φαίνεται ότι έχουν η θερμοκρασία, το pH και η ενεργότητα

νερού (aw). Όπως σε άλλα βακτήρια, η ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού σε διάφορα περιβαλλοντικά εμπόδια (συνθήκες συντήρησης και/ή επεξεργασίας) γίνεται μέγιστη όταν όλοι οι παραπάνω παράγοντες βρίσκονται σε βέλτιστα (optimum) επίπεδα.

Τα βακτήρια δεν μπορούν να απομονωθούν πλήρως από την παραγωγή των πρώτων ζωικών ή φυτικών προϊόντων. Ως εκ τούτου, στην επεξεργασία των τροφίμων πρέπει να είναι αδρανοποιημένα ή θανατωμένα ώστε να μην επιτυγχάνεται η ανάπτυξη τους. Η μικροβιακή σταθερότητα και ασφάλεια των περισσότερων τροφίμων βασίζεται σε ένα συνδυασμό διαφόρων παραγόντων (εμπόδια), οι οποίοι θα πρέπει να παρεμποδίζουν τους μικροοργανισμούς που εμφανίζονται στο τρόφιμο. Ο ρόλος των εμποδίων αυτών θεωρείται θεμελιώδους σημασίας για την συντήρηση των τροφίμων, καθώς η παρουσία τους σε ένα σταθερό προϊόν μπορεί και ελέγχει την μικροβιακή αλλοίωση και μίανσή του (Leistner 1978, Leistner et al., 1981).

Ο *Listeria monocytogenes* έχει αναδειχθεί ως ένα σημαντικό τροφιμογενές παθογόνο (WHO, 1988) και είναι μοναδικό στην ανοχή του ως προς τους προαναφερθέντες παράγοντες που θα έπρεπε κανονικά να εμποδίζουν την ανάπτυξη και την επιβίωση του.

Περιπτώσεις λιστερίωσης έχουν αναφεθεί από σχεδόν όλα τα μέρη του κόσμου. Η τρέχουσα εκτίμηση της συχνότητας λιστεριώσεων είναι 2-15 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο πληθυσμού (Mead et al., 1999). Αυτοί οι αριθμοί περιλαμβάνουν σποραδικές αλλά και ομαδικές περιπτώσεις. Είναι σαφές ότι η ακρίβεια της εκτίμησης εξαρτάται από την ακρίβεια της διάγνωσης και την υποβολή έκθεσης συμβάντος. Η εκτίμηση των σποραδικών περιπτώσεων στις Ηνωμένες Πολιτείες γίνεται από ένα ολοκληρωμένο σύστημα επιτήρησης, το αποκαλούμενο FoodNet. Το σύστημα καλύπτει 20.5 εκατομμύρια ανθρώπους σε διάφορες Πολιτείες. Τα αποτελέσματα από τις πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες του FoodNet υπολογίζουν 2518 περιπτώσεις λιστερίωσης το χρόνο, με ένα θανατηφόρο περιστατικό περίπου ανα 500 ασθενείς. Αυτός ο αριθμός είναι περίπου 10 περιπτώσεις ανά ένα εκατομμύριο πληθυσμού (Mead et al., 1999). Η συντριπτική πλειοψηφία των σποραδικών περιπτώσεων λιστερίωσης συνδέεται με την κατανάλωση προϊόντων κρέατος και τυριών χαμηλής οξύτητας (Pinner et

al., 1992). Αντίθετα οι περιπτώσεις ομαδικών λιστεριώσεων συνδέθηκαν με αρκετά είδη τροφίμων. Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* έχει απομονωθεί ουσιαστικά από όλα τα είδη τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων φυτικής και ζωικής προέλευσης

Λόγω του ότι το βακτήριο *L. monocytogenes* μπορεί να επιζήσει σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι απομονώνεται από το χώμα, το νερό, και από χώρους επεξεργασίας τροφίμων. Εντούτοις, για να είναι σε θέση να προκαλέσει ασθένεια, θα πρέπει τα διάφορα τρόφιμα και οι συνθήκες αποθήκευσής τους να παρέχουν ένα κατάλληλο περιβάλλον για την επιβίωση και κατά περιόδους, την ανάπτυξή της.

1.6 Λιστερίωση και κρούσματα

Αν και οι ετήσιες περιπτώσεις λιστερίωσης σε ανθρώπους είναι σπανιότερες σε σύγκριση με άλλες τροφιμογενείς ασθένειες, τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας που παρουσιάζει (περίπου 20%) καθιστούν τον μικροοργανισμό ως ένα από τους σημαντικότερους κινδύνους για την δημόσια υγεία.

Πολλοί άνθρωποι έρχονται συχνά σε επαφή με τον μικροοργανισμό, εντούτοις μόνο λίγοι είναι αυτοί που εκδηλώνουν τα συμπτώματα της λιστερίωσης. Η ασθένεια προσβάλλει συνήθως ομάδες ευπαθών ατόμων, όπως είναι οι έγκυες γυναίκες, τα νεογνά, οι ηλικιωμένοι και τα άτομα που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή. Ωστόσο, υπάρχει πιθανότητα, υγιή άτομα που δεν ανήκουν στις παραπάνω κατηγορίες να προσβληθούν από τον παθογόνο (Slutsker and Schuchat, 1999). Οι περισσότερες περιπτώσεις λιστερίωσης εμφανίζονται σποραδικά, όμως, ορισμένες από αυτές τις περιπτώσεις μπορούν να συνδεθούν με κοινές πηγές μόλυνσης, οι οποίες παραμένουν ανεξακρίβωτες (Ciesielski et al., 1988). Γενικά, οι πηγές και η πορεία της ασθένειας δεν έχουν προσδιοριστεί επακριβώς, εντούτοις, η σχέση μεταξύ της προσβολής και διαφόρων τροφιμογενών επιδημιών οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα τρόφιμα μπορεί να αποτελούν μία από τις βασικότερες πηγές του παθογόνου (Farber and Peterkin, 1991).

Περιπτώσεις Λιστερίωσης έχουν αναφερθεί σχεδόν από όλα τα μέρη του κόσμου. Σημαντικό είναι να τονιστεί ότι η εκτίμηση των περιστατικών παίζει σημαντικό ρόλο από την διάγνωση και την καταγραφή τους.

Έτος	Τρόφιμο	Χώρα	Κρούσματα (%θνησιμότητα)
1980–8	Λαχανοσαλάτα (ωμά λαχανικά)	Listeria monocytogenes Καναδάς	41(34)
1983	Παστεριωμένο γάλα	Μασαχουσέτη	49(29)
1984	Μαλακό τυρί	Ελβετία	57(32)
1985	Τυρί Jalisco (μεξικανικού τύπου γάλα)	Καλιφόρνια	142(34)
1987–8	Πατέ	Ηνωμένο Βασίλειο	823(άγνωστο)
1992	Μερίδες χοιρινού	Γαλλία	38(32)
1993	Ριζοσαλάτα	Ιταλία	39(0)
1994	Σοκολατούχο γάλα	Ιλλινόις	45(0)
1997	Σαλάτα καλαμποκιού	Ιταλία	1566(0)
1998–9	Χοι ντόγκ, έτοιμα προς κατανάλωση κρεατοσκευάσματα	ΗΠΑ	101(21)
1998–9	Βούτυρο	Φινλανδία	25(24)
1999	Γλώσσα χοιρινού	Γαλλία	32(31)
2000	Έτοιμα προς κατανάλωση κρεατοσκευάσματα γαλοπούλας	ΗΠΑ	29(7)
2000- 2001	Μεξικάνικο τύπο τυριού	ΗΠΑ	12 (5)
2002	Έτοιμα προς κατανάλωση κρεατοσκευάσματα γαλοπούλας	ΗΠΑ	46 (15)
2011	Πεπόνι	ΗΠΑ	147
2012	Frescolina Marte Ricotta	ΗΠΑ	42(1)

Πίνακας 1. Κρούσματα λιστερίωσης

1.7 ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ

Όπως τα περισσότερα Gram-θετικά βακτήρια, ο *L. monocytogenes* έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται ικανοποιητικά στα περισσότερα βακτηριολογικά μέσα, όπως Trypticase Soy, Tryptose και Brain Heart Infusion broths. Η παρουσία αφομοιώσιμων υδρογονανθράκων, κυρίως γλυκόζης, στο μέσο αυξάνει το βαθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Σημαντικοί παράγοντες ανάπτυξης είναι, επίσης, οι βιταμίνες βιοτίνη, ριβοφλαβίνη, θειαμίνη και θειοκτικό οξύ καθώς και τα αμινοξέα κυστίνη, γλουταμίνη, ισολευκίνη, αργινίνη, μεθειονίνη, βαλίνη και κυστεΐνη (Welshimer, 1963; Siddiqi and Khan, 1982). Βασικές πηγές αζώτου και άνθρακα είναι η γλουταμίνη και η γλυκόζη (η οποία μεταβολίζεται μέσω του μονοπατιού Embden-Meyerhof), αντίστοιχα. Παράλληλα, η ανάπτυξη του μικροοργανισμού ευνοείται από την παρουσία ενώσεων σιδήρου, οι οποίες αναφέρεται ότι συμμετέχουν στην διαδικασία της μόλυνσης (Chakraborty and Goebel, 1988).

1.8 ΦΑΣΗ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Με τον όρο ανάπτυξη στην μικροβιολογία νοείται η φυσιολογική ανάπτυξη όλων των συστατικών ενός μικροοργανισμού. Σε όλες τις περιπτώσεις των μονοκύτταρων μικροοργανισμών, όπως τα βακτήρια, ο όρος ανάπτυξη χρησιμοποιείται με την έννοια της αναπαραγωγής και δείχνει την ανάπτυξη του κυτταρικού πληθυσμού μιας καλλιέργειας. Η βακτηριακή αναπαραγωγή είναι στην πραγματικότητα το αποτέλεσμα εναλλαγών ανάπτυξης και κυτταρικών διαιρέσεων. Χάρη στην ύπαρξη των θρεπτικών συστατικών του μέσου ανάπτυξης, τα βακτήρια είναι το κέντρο συνθέσεων και διασπάσεων, που ρυθμίζονται από νουκλεϊνικά οξέα.

Η μικροβιακή ανάπτυξη είναι μια αυτοκαταλυτική διαδικασία: ανάπτυξη δεν μπορεί να συμβεί χωρίς την παρουσία τουλάχιστον ενός ζωντανού κυττάρου, ενώ η βιομάζα θα αυξάνεται σύμφωνα με την μαθηματική εξίσωση:

$$dx/dt = \mu x$$

όπου dx/dt είναι ο ρυθμός μεταβολής της βιομάζας ή ο αριθμός των κύτταρων σε χρόνο x , και μ είναι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης.

Με την ολοκλήρωση της προαναφερόμενης εξίσωσης έχουμε την μορφή:

$$x = x_0 e^{\mu t}$$

Η εξίσωση αυτή παρουσιάζεται γραφικά στο σχήμα:

Η σιγμοειδής αυτή καμπύλη που περιγράφει την ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού χωρίζεται σε τέσσερις βασικές φάσεις:

1. Φάση Προσαρμογής (lag phase)
2. Εκθετική Φάση (exponential phase)
3. Φάση Σταθεροποίησης (stationary phase)
4. Φάση Θανάτου (death phase)

Όταν οι μικροοργανισμοί προστίθενται σε νέο θρεπτικό μέσο, συνήθως δεν παρατηρείται αύξηση του αριθμού τους για κάποιο χρονικό διάστημα. Το στάδιο αυτό ονομάζεται Φάση Προσαρμογής. Κατά την φάση αυτή ο μικροοργανισμός προσπαθεί να προσαρμοστεί και να εναρμονίσει τις ενεργειακές του ανάγκες σύμφωνα με το νέο περιβάλλον στο οποίο βρέθηκε. Καθώς βασικό σκοπό της μικροβιολογίας τροφίμων αποτελεί η επιβράδυνση ή η αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοιώσεις, οι προσπάθειες κατευθύνονται στην επιμήκυνση κατά το δυνατό της φάσης προσαρμογής.

Η διάρκεια της φάσης προσαρμογής επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως, την ταυτότητα και τον φαινότυπο του βακτηρίου (Buchaman and Cygnarowicz 1990), το μέγεθος του εμβολίου (Baranyi και Roberts. 1994), τη

φυσιολογική κατάσταση του πληθυσμού (McMeekin et al., 1993) καθώς και από τις αλλαγές στο φυσικοχημικό περιβάλλον, όπως θερμοκρασία, pH, ενεργότητα νερού και διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών (Buchanan και Cygnarowicz 1990, Zwietering et al. 1994). Η φάση προσαρμογής είναι μικρότερη αν το εμβόλιο είναι μεταβολικά πιο ενεργό, όπως για παράδειγμα εάν βρίσκεται στην εκθετική του φάση, από ότι αν η δραστηριότητα του είναι χαμηλή, όπως στην στατική φάση (Baranyi και Roberts. 1994).

Μελετώντας την επίδραση των μεταβολών και διακυμάνσεων της θερμοκρασίας στον ρυθμό ανάπτυξης, αρκετοί συγγραφείς έχουν αναφερθεί στις επιπτώσεις αυτών στην διάρκεια της φάσης προσαρμογής (Walker et al. 1990, Buchanan και Klawitter 1991, Fu et al. 1991, Blackburn and Davies 1994, Gay et al. 1996, Membré et al. 1999, Gill et al. 2001, Mellefont και Ross, in press). Όσον αφορά τη θερμοκρασία, συχνά έχει παρατηρηθεί ότι η φάση προσαρμογής είναι αντιστρόφως ανάλογη προς το μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (Smith 1985, Chandler 1988, Mackey και Kerridge 1988, McMeekin et al. 1993, Baranyi and Roberts 1994).

Αν και οι επιδράσεις της θερμοκρασίας, έχουν αποτελέσει το επίκεντρο της έρευνας σε σχέση με την συμπεριφορά της φάσης προσαρμογής, άλλες παράμετροι του περιβάλλοντος, όπως το pH, τα αέρια της ατμόσφαιρας, η περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά και η ενεργότητα νερού, συμβάλλουν στο δυναμικό του περιβάλλοντος των μικροοργανισμών. Η αύξηση της οξύτητας ή της αλκαλικότητας του μέσου ανάπτυξης προκαλεί μια αύξηση στο χρόνο προσαρμογής (Buncic και Avery 1995, Cheroutre-Vialette et al. 1998, Robinson et al. 1998, Vasseur et al., 1999). Αλλαγές στο οσμωτικό περιβάλλον των κυττάρων μπορούν επίσης να επηρεάσουν έμμεσα την φάση προσαρμογής λόγω μείωσης της a_w από την προσθήκη σακχαρόζης, KCl και NaCl (Brocklehurst et al. 1995, Cheroutre-Vialette et al. 1998, Robinson et al. 1998, Vasseur et al. 1999, Delamere et al 2000).

Κατά την επεξεργασία ορισμένων τροφίμων, δυνητικά παρόντες παθογόνοι μπορούν να εκτεθούν σε οσμωτικό σοκ. Για παράδειγμα στην παρασκευή κρεάτων που έχουν υποστεί ζύμωση, 2-3% (w / w) NaCl προστίθεται στο μίγμα, οδηγώντας σε μείωση της ενεργότητας νερού στην υδατική φάση από 0.992 σε

0.96, γεγονός που μπορεί να συμβάλλει στην μείωση της παθογόνου αύξησης, μέχρι η περαιτέρω ξήρανση και μείωση του pH να εμποδίσει την ανάπτυξη αυτών. Ομοίως, κατά την επεξεργασία κατεψυγμένων καπνιστών ψαριών, ένα ισχυρό διάλυμα αλατιού ή ακόμα και ξηρό αλάτι μπορούν να εφαρμοστούν στα φιλέτα ψαριών. Η τελική ενεργότητα νερού, ωστόσο, μπορεί να επιτρέψει αύξηση ορισμένων Gram-θετικά παθογόνων. Η εγκατάσταση μιας μακράς φάσης προσαρμογής κατά το στάδιο του αλατίσματος θα μπορούσε να συμβάλει στην ασφάλεια των προϊόντων.

Από τα παραπάνω, υποθέτουμε πως ο χρόνος προσαρμογής ανταποκρίνεται στις μεταβολές του περιβάλλοντος όπως περίπου και ο ρυθμός ανάπτυξης, δηλαδή όπως ο χρόνος γενεάς είναι ένα μέτρο μεταβολικού ρυθμού σε ένα νέο περιβάλλον, έτσι και ο χρόνος προσαρμογής σχετίζεται με την «σκληρότητα» του περιβάλλοντος. Σύμφωνα με τους Robinson et al. (1998) και Ross, η προσαρμογή θα μπορούσε να καθοριστεί από δυο παραμέτρους: το έργο που απαιτείται για την προσαρμογή στο νέο περιβάλλον και τον βαθμό στον οποίο το έργο αυτό μπορεί να γίνει. Οι Robinson et al. (1998) όρισαν ως έργο τις διάφορες βιοσυνθετικές και ομοιοστατικές αντιδράσεις που είναι αναγκαίες για την προετοιμασία για ανάπτυξη στο νέο περιβάλλον. Ωστόσο, θεωρούμε ότι οι επιπτώσεις των αυξημένων ομοιοστατικών απαιτήσεων είναι πιο πιθανό να εκδηλωθούν ως μείωση του ρυθμού ανάπτυξης. Έτσι, το ποσοστό του έργου που πρέπει να γίνει για την επίτευξη της προσαρμογής αφορά μόνο τις πρόσθετες απαιτήσεις για βιοσύνθεση ώστε να προσαρμοστούν στο νέο περιβάλλον. Το ποσοστό του έργου εξαρτάται από τη «σκληρότητα» του νέου περιβάλλοντος και τον βαθμό στον οποίο αυτό οριοθετεί τον μεταβολικό ρυθμό ή μεταβάλλει την μεταβολική δραστηριότητα στις ομοιοστατικές διεργασίες.

Το ποσοστό του έργου που πρέπει να γίνει είναι μια υποθετική ποσότητα και ως τέτοια δεν μπορεί να μετρηθεί απευθείας. Ωστόσο, ο χρόνος προσαρμογής μπορεί να μετρηθεί και ο ρυθμός με τον οποίο το έργο μπορεί να γίνει, συμπεραίνεται από τον χρόνο γενεάς και πιο συγκεκριμένα από τον συνεχή ρυθμό ανάπτυξης (το αντίστροφο του χρόνου γενεάς). Συνεπώς, αν μια βακτηριακή αποικία εισάγεται σε ένα νέο περιβάλλον, ο λόγος του χρόνου προσαρμογής προς τον χρόνο γενεάς σε αυτό το περιβάλλον θα αποτελεί μέτρο

της ποσότητας του έργου που πρέπει να γίνει από το κύτταρο πριν την ανάπτυξη (Ross, 1999). Ο λόγος αυτός μπορεί να θεωρηθεί ως ο σχετικός χρόνος προσαρμογής, RLT, ή "ισοδύναμος χρόνος γενεάς".

1.9 Συντήρηση τροφίμων

Η οξίνιση των τροφίμων είναι μια κοινή μέθοδος συντήρησης των τροφίμων που χρησιμοποιείται σε όλο τον κόσμο. Αυτό επιτυγχάνεται είτε μέσω ζύμωσης ή την προσθήκη ειδικών συντηρητικών τροφίμων όπως οξικό οξύ, προπιονικό οξύ και γαλακτικό οξύ ή και με την προσθήκη μέσων όξυνσης όπως το υδροχλωρικό και το φωσφορικό οξύ. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται ασθενή οργανικά οξέα, καθώς έχει αποδειχθεί ότι, παράλληλα με την ιδιότητά τους να μειώνουν το pH, έχουν μεγαλύτερη αντιμικροβιακή ικανότητα σε σχέση με τα ισχυρά οξέα (Adams and Moss, 1995).

Επίσης στη βιομηχανία τροφίμων, το αλάτισμα είναι μια μέθοδος συντήρησης των τροφίμων όπου έχουν σχεδιαστεί κυρίως για να εξασφαλίσουν χαμηλότερη ενεργότητα νερού. Ωστόσο, ο *L. monocytogenes* είναι σε θέση να επιβιώσει σε υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης άλατος όπως θα αναφέρουμε παρακάτω.

1.10 Επίδραση pH στη *Listeria monocytogenes*

Η οξύτητα ή η αλκαλικότητα ενός περιβάλλοντος έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει την δράση και την σταθερότητα των μακρομορίων, όπως είναι τα ένζυμα. Κατά συνέπεια, η ανάπτυξη και ο μεταβολισμός των μικροοργανισμών έχει άμεση σχέση με τις τιμές του pH του περιβάλλοντός τους (Adams and Moss, 1995). Ένας κοινός παράγοντας – εμπόδιο, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, που χρησιμοποιείται στα τρόφιμα είναι το pH. Όπως πολλά άλλα βακτήρια, ο *L. monocytogenes* παρουσιάζει μέγιστη ανάπτυξη σε pH μεταξύ 6 και 8, με πιθανή ανάπτυξη μεταξύ 4.1 και 9.6

(Pearson and Marth, 1989, Tienungoon et al., 2000). Η αύξηση σε μέσα ανάπτυξης σε τιμές pH τόσο χαμηλές όπως 4.3 (Farber et al, 1989), 4,39 (George et al., 1988), 4.4 (Sorrells et al., 1989) και 4.5 (McClure et al., 1989) έχει αναφερθεί από τότε.

Μια σειρά παραγόντων (εμποδίων) όμως μπορεί να επηρεάσει τα όρια του pH ως προς την ανάπτυξη και την επιβίωση του *L. monocytogenes*, συμπεριλαμβανομένων διασταυρούμενων παραγόντων προστασίας από άλλες καταπονήσεις όπως τη θερμοκρασία, το μέγεθος εμβολίου και τις ιδιότητες του μέσου ανάπτυξης (Cole et al, 1990; McClure et al, 1989; Tienungoon et al, 2000; Vermeulin et al, 2009). Έρευνες έχουν δείξει ότι ο μικροοργανισμός μπορεί να επιβιώσει και σε τιμές pH μικρότερες από 4.1. Ιδιαίτερα στην περίπτωση που εκτεθεί σε όξινο περιβάλλον πριν από τον εμβολιασμό του (acid adaptation), μπορεί να παρουσιάσει πολύ υψηλή οξυαντοχή, , ιδιαίτερα εάν προετοιμάζεται σε ηπιότερες τιμές pH. Αυτή η προετοιμασία του προσφέρει ανθεκτικότητα από άλλες φυσιολογικές καταπονήσεις, όπως αυτές που εφαρμόζονται σε επίπεδα επεξεργασίας τροφίμων- παραγωγής (Vasseur et al., 1999; Tienungoon et al, 2000; Giotis et al, 2008).

Πειράματα που διεξήχθησαν σε salad dressing (pH=3.0), χυμό πορτοκαλιού (pH=3.76) και γιαούρτι (pH=3.9) έδειξαν ότι τα κύτταρα, που είχαν προηγουμένως προσαρμοστεί σε όξινο περιβάλλον (pH=5.5 για 1 ώρα), παρέμειναν ανιχνεύσιμα για περισσότερο από 90 λεπτά, 7 ώρες και 48 ώρες αντίστοιχα (Gaham et al., 1996).

Επίσης μία ακόμα έρευνα έδειξε πως ο η *Listeria monocytogenes* βρέθηκε να επιβιώνει της διαδικασίας ζύμωσης (pH 4,39 έως 4,63), ξήρανσης (a_w 0,76 έως 0,80) και μετέπειτα συντήρησης ξηρού ζυμωμένου λουκάνικου για 49 ημέρες στους 17-23 ° C, σημειώνοντας συνολικά μείωση μικρότερη από 3 log CFU / g (Lahti et al, 2001; Nissen et Holck, 1998; Thevenot et al, 2005). Επίσης οι Parish et Higgins (1989) έδειξαν ότι η *L. monocytogenes* σε χυμό πορτοκαλιού σε pH 3,6 έως 5,0 επιβιώνει σε θερμοκρασία συντήρησης 4°C, 21 και 90 ημέρες αντίστοιχα.

1.11 Ενεργότητα νερού

Η ενεργότητα νερού (a_w), αποτελεί ένα μέτρο της οσμωτικής δυναμικότητας ενός μέσου ανάπτυξης. Ορίζεται ως ο λόγος της πίεσης ατμών ενός μέσου ανάπτυξης (σε ισορροπία με την περιβάλλουσα ατμόσφαιρα) προς την πίεση ατμών του καθαρού νερού υπό τις ίδιες συνθήκες (Sutherland και Porritt, 1997). Ουσιαστικά, η ενεργότητα του νερού αντιπροσωπεύει το διαθέσιμο νερό για την ανάπτυξη. Η τιμή της ενεργότητας του νερού στα τρόφιμα μπορεί να μειωθεί, είτε με διάλυση ουσιών (αλάτι, ζάχαρη) στην υδάτινη φάση, είτε με απομάκρυνση ενός μέρους από την περιεχόμενη υγρασία με ξήρανση, αφυδάτωση ή κατάψυξη. Στην πρώτη περίπτωση μερικά από τα μόρια του νερού προσανατολίζονται προς τα μόρια των διαλυμένων ουσιών ή προσροφούνται από τα αδιάλυτα συστατικά του τροφίμου. Έτσι παύουν να είναι διαθέσιμα για να μπορούν να χρησιμοποιηθούν από το μικροβιακό κύτταρο

Ο *L. monocytogenes* έχει μια ελάχιστη απαίτηση ενεργότητας νερού η οποία κυμαίνεται μεταξύ 0,91 και 0,93, ανάλογα με την διαλυμένη ουσία στο μέσο ανάπτυξης, καθώς επίσης σημαντικό ρόλο παίζει και το στέλεχος του *L. monocytogenes* (Farber et al., 1992.. Ross et al, 2000). Η βέλτιστη τιμή ενεργότητας νερού για την ανάπτυξη του *L. monocytogenes* έχει προσδιοριστεί να είναι μεταξύ 0,98 και 0,99 (Tienungsoon et al., 2000). Η *L. monocytogenes* έχει κατώτατο όριο ενεργότητας νερού για ανάπτυξη περίπου 0.90 στους 30°C, όταν χρησιμοποιείται η γλυκερόλη για την ρύθμισή της (Faber et al., 1992) και περίπου 0.92 και 0.93 όταν χρησιμοποιείται NaCl και σουκρόζη, αντίστοιχα (Faber et al., 1992, Miller, 1992). Επιβίωση, ωστόσο, έχει παρατηρηθεί σε σαλάμι με ενεργότητα νερού 0.79-0.86, συντηρούμενο στους 4°C (Johnson et al., 1988). Όπως και με τα υπόλοιπα όρια αύξησης, η ανοχή στη μειωμένη ενεργότητα νερού έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει μετά από έκθεση σε άλλες καταπονήσεις, όπως pH και NaCl (Giotis et al., 2008; Vogel et al., 2010). Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η μειωμένη ανοχή σε ενεργότητα νερού πιστεύεται ότι είναι ένας

σημαντικός παράγοντας που συμβάλλει στην περιβαλλοντική επιβίωση των στελεχών του *Listeria* (Vogel et al., 2010).

1.12 Επίδραση NaCl στη *Listeria monocytogenes*

Υπάρχουν αρκετές αναφορές ότι ο *L. monocytogenes* μπορεί να αναπτυχθεί σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις NaCl (Seeliger, 1961; Shahamat et al, 1980; McClure et al, 1989). Ο *L. monocytogenes* είναι ένα ανεκτικός μικροοργανισμός στο άλας ικανός να αναπτύσσεται σε μία συγκέντρωση NaCl έως 10% (βάρος / όγκο) (Seeliger et Jones, 1987). Οι Shahamat et al (1980) έδειξαν ότι ο *L. monocytogenes* αδρανοποιήθηκε σε μέσα που περιέχουν 5, 10, 13 και 25.5% NaCl μετά από 4-15 ημέρες στους 37 ° C. Επίσης παρατήρησαν ότι το νιτρώδες άλας αναστέλλει την ανάπτυξη του *L. monocytogenes* μόνο όταν βρίσκεται σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 3.0% NaCl και τιμή pH στο ή κάτω από 5.5 σε ψυχρές θερμοκρασίες συντήρησης.

Αποτελέσματα σε μελέτες έδειξαν ότι σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του NaCl, η μέγιστη πυκνότητα πληθυσμού (MPD- maximal population density) μειώθηκε και ο χρόνος διπλασιασμού αυξήθηκε. Η μέγιστη συγκέντρωση που επέτρεπε την αύξηση του μικροοργανισμού στους 30°C ήταν 12% NaCl ενώ σε χαμηλότερες παρατηρήθηκε μείωση στο MPD και αυξήθηκε ο χρόνος που απαιτείται για να επιτευχθεί η μέγιστη συγκέντρωση των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, στους 4°C τα βακτήρια χρειάζονται δύο ή τρεις φορές περισσότερο χρόνο για να φθάσουν στην MPD από εκείνους στους 30 °C. Επιπλέον, συγκεντρώσεις NaCl υψηλότερες από 10% μείωσαν τη μολυσματικότητα του παθογόνου (invasion) στους 30°C, ενώ η *L. monocytogenes* που αναπτύχθηκε στους 4°C και σε συγκέντρωση NaCl μεταξύ 3 και 12% διατηρούσε ακόμη κάποιο επίπεδο μολυσματικότητας. (Galeiro et al , 1997)

1.13 Επίδραση θερμοκρασίας στη *Listeria monocytogenes*

Ο *L. monocytogenes* μπορεί να επιβιώσει και να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες κυμαινόμενες από -0.4°C έως 45°C (Chan et Wiedmann, 2009, Gray et al, 1948;. Walker et al, 1990.). Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης για *L. monocytogenes* είναι μεταξύ 30°C και 37°C , και οποιαδήποτε θερμοκρασία πάνω από αυτό το βέλτιστο εύρος αναμένεται να ασκήσει μια επιπρόσθετη πίεση (Petran et Zottola, 1989). Οι μελέτες έχουν δείξει ότι αυξημένη ανθεκτικότητα σε έναν μικροοργανισμό σε μεταγενέστερη έκθεση σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις όπως το pH, άλας και απολύμανση μπορεί να προσφέρει η βέλτιστη ανάπτυξη σε αυξημένες θερμοκρασίες (Kastberg et al, 2009;. Kagkli et al, 2009; Cole et al, 1990; Patchet et al, 1996).

Η ικανότητα του μικροοργανισμού να αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες ψύξης ($0 - 4^{\circ}\text{C}$), δημιουργεί πρόβλημα στις βιομηχανίες τροφίμων, καθώς έχει μελετηθεί παρατεταμένη επιβίωση και ανάπτυξη στους 4°C (Chan and Wiedmann, 2009; Wilkins et al, 1972.).

Όπως με όλες τις διαδικασίες αδρανοποίησης, έτσι και η θερμοκρασία θανάτωσης είναι στοχαστική, με την ταχύτητα αδρανοποίησης να αυξάνεται κατά 10% (περίπου) για κάθε 6°C αύξηση της θερμοκρασίας (Mackey et Bratchell, 1989). Περαιτέρω σε αυτό, ο ρυθμός αδρανοποίησης εξαρτάται από το μέγεθος του αρχικού εμβολίου, καθώς και άλλες ιδιότητες του μέσου ανάπτυξης (Mackey et Bratchell, 1989). Με ένα εμβόλιο περίπου 10 σχηματισμένων αποικιών (cfu) / g, μελέτες έχουν δείξει ότι οι θερμοκρασίες μεταξύ 67 και 69°C θα μειώσουν τον πληθυσμό κατά 90% μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα, και την εξάλειψη σε ρεαλιστικά επίπεδα μόλυνσης εντελώς σε 30 - 60 δευτερόλεπτα (Gaze et al, 1989;. Farber, 1989; Mackey και Bratchell, 1989).

Έρευνα του 1999 που διεξήγαγε ελέγχους θερμοκρασίας προϊόντων έδειξε ότι η μέση θερμοκρασία των 27% των προϊόντων διατροφής στις ΗΠΑ σε ψυγεία

σπιτιού ήταν άνω των 5 ° C. Στην ίδια μελέτη, η μέση θερμοκρασία των αλλαντικών στις ΗΠΑ έχει αναφερθεί μεγαλύτερη από 7 ° C. Οι θερμοκρασίες λοιπόν κατά τη διάρκεια της διανομής και αποθήκευσης και μεταφοράς στο σπίτι του ψυγείου τροφίμων βρέθηκε να είναι συχνά υψηλότερη από 4 ° C, η οποία είναι η συνιστώμενη θερμοκρασία ψύξης κατ'ανώτατο όριο.

Οι Wood et Woodbine (1979) βρήκαν ένα στέλεχος του *L. monocytogenes* με υψηλότερη μολυσματικότητα μετά από ανάπτυξη στους 4 αντί 37 ° C. Υπάρχει η πιθανότητα ότι η συντήρηση σε χαμηλές θερμοκρασίες ενισχύει την μολυσματικότητα του *L. monocytogenes*.

1.14 *Listeria monocytogenes* απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης (στρες)

Για την καλύτερη κατανόηση του φαινομένου του stress adaptation παρατίθενται ορισμένοι βασικοί ορισμοί, που περιγράφουν τις καταστάσεις στις οποίες εισέρχονται οι μικροοργανισμοί:

- Καταπόνηση (stress): Ο όρος stress αναφέρεται σε κάθε επιβλαβή παράγοντα ή κατάσταση που επιδρά ανασταλτικά στην μικροβιακή ανάπτυξη ή επιβίωση. Ανάλογα με την έντασή του, διαχωρίζεται σε ήπιο (mild), μέτριο (moderate) ή ακραίο (severe). Κατά την παραγωγική διαδικασία, πολλές μεταχειρίσεις μπορούν να θεωρηθούν ως stress, όπως, για παράδειγμα, οι φυσικές μεταχειρίσεις (θέρμανση, πίεση, υπέρηχοι, ακτινοβολία, ωσμωτικό σοκ), η προσθήκη χημικών (οξέων, αλάτων) και τα βιολογικής προέλευσης stress (ανταγωνιστική χλωρίδα, μικροβιακοί μεταβολίτες).

- Αντίδραση σε συνθήκες καταπόνησης (stress response): Από την στιγμή που ένας μικροοργανισμός αντιλαμβάνεται την παρουσία κάποιου στρεσογόνου παράγοντα, στα κύτταρά του λαμβάνουν χώρα διάφορες μεταλλαγές όπως αλλαγή στην ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης (ψυχρό σοκ), αλλοδόμηση κυτταρικών πρωτεϊνών ή διάσπαση ριβοσωμάτων (θέρμανση), αλλαγή νουκλεϊκών οξέων (ακτινοβολία γ), σύνθεση νέων πρωτεϊνών (χαμηλό pH) κ.α.

- Προσαρμογή (adaptation): Όταν ένας μικροοργανισμός εκτεθεί σε συνθήκες καταπόνησης, μπορεί να αναπτύξει κάποιους μηχανισμούς προσαρμογής ή προστασίας. Η αντίδρασή του, στην περίπτωση αυτή, αυξάνει την αντοχή του στο ίδιο ή διαφορετικό είδος stress (cross protection). Το φαινόμενο αυτό καλείται αντίδραση προσαρμογής (adaptive response) ή σκληραγώγηση (stress hardening).

- Αντοχή (tolerance): Η αντοχή ενός μικροοργανισμού σε κάποιο παρεμποδιστικό παράγοντα (π.χ. χαμηλό pH) αναφέρεται στην ικανότητά του να επιβιώνει σε κάποιου είδους stress.

- Τραυματισμός (Injury): Οποιαδήποτε φθορά κυτταρικών συστατικών λόγω κάποιου stress, μπορεί είτε να μειώσει την ικανότητα αναπαραγωγής των μικροοργανισμών είτε να ευαισθητοποιήσει τα κύτταρα απέναντι σε ηπιότερους ανασταλτικούς παράγοντες. Αυτές οι αλλαγές περιγράφονται συνήθως με τον όρο «τραυματισμός». Τα τραυματισμένα κύτταρα μπορεί να ανακάμψουν ή να πεθάνουν.

Οι μικροοργανισμοί έρχονται αντιμέτωποι με πληθώρα υποθανάτιων stress στο περιβάλλον ή εντός των τροφίμων. Αυτά τα stress μπορούν να προκαλέσουν μία αντίδραση προσαρμογής, η οποία καθιστά τους παθογόνους περισσότερο ανθεκτικούς κατά την μετέπειτά έκθεσή τους σε θανατηφόρες καταστάσεις. Για το λόγο αυτό, η προσαρμογή των παθογόνων μικροοργανισμών σε τέτοιου είδους stress, θεωρείται σοβαρότατος κίνδυνος για την υγεία των καταναλωτών (Yousef and Courtney, 2003).

Ο Yousef και Courtney (2003) ορίζουν μικροβιακό στρες, κάθε επιβλαβείς παράγοντες φυσικούς, χημικούς ή βιολογικούς που επηρεάζουν αρνητικά την ανάπτυξη μικροβίων ή την επιβίωση. Ως εκ τούτου, οι παραδοσιακές ή νέες τεχνικές συντήρησης των τροφίμων, όπως η χρήση άλμης, pH, υψηλή υδροστατική πίεση, ιονίζουσα ακτινοβολία, παλμικά ηλεκτρικά πεδία, και UV ακτινοβολία μπορεί να θεωρηθούν ως μικροβιακοί στρεσογόνοι παράγοντες. Αυτά τα "εμπόδια" μπορεί να εισάγουν διάφορους βαθμούς "στρες" σε διάφορα βακτήρια. Αυτοί οι στρεσογόνοι παράγοντες επηρεάζουν τη φυσιολογία, τη λειτουργία, και τη δραστηριότητα των μικροοργανισμών (ενδογενών, παθογόνων, αλλοιογόνων) που βρίσκονται στα τρόφιμα. Με βάση την ένταση του σχετικού στρες, αυτό μπορεί να διαφοροποιηθεί είτε ως «υποθανάτιο» ή "θανατηφόρο (θνησιγόνο) ή ακραίο". Το υποθανάτιο στρες τροποποιεί τις μεταβολικές δραστηριότητες των κυττάρων. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε μικροβιακό "τραυματισμό" και μπορεί να εκδηλωθεί είτε ως καθυστέρηση στην ανάπτυξη ή πλήρης αναστολή της ανάπτυξης (Donnelly, 2002).

Ακραία ή θανατηφόρα καταπόνηση προκαλεί ανεπανόρθωτες βλάβες στα μικροβιακά κύτταρα. Όταν μικροοργανισμοί εκτίθενται σε υποθανάτια

καταπόνηση , είναι γενικά αποδεκτό ότι αυτή η έκθεση μπορεί να προκαλέσει την προσαρμογή στα μετέπειτα θανατηφόρα επίπεδα έκθεσης του ίδιου τύπου στρες (stress adaptation) (Lou et Yousef, 1997). Προσαρμογή στο στρες μπορεί επίσης να περιγραφεί ως το φαινόμενο, κατά το οποίο η έκθεση ενός μικροοργανισμού σε ένα υποθανάτιο στρες μπορεί να το καταστήσει πιο ανθεκτικό έναντι της ίδιας καταπόνησης μεγαλύτερης έντασης ή ακόμη και σε ένα διαφορετικό στρες (Hill et al., 2002).

Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των τροφίμων, οι μικροοργανισμοί μπορούν να προσαρμοστούν στα «εμπόδια» ή στους στρεσογόνους παράγοντες και μπορούν να επιβιώσουν κάτω από συνθήκες που κανονικά θα είχαν αδρανοποιηθεί (Beales, 2004). Προσαρμοσμένα σε οξύ κύτταρα *L. monocytogenes* είναι πολύ πιο ανθεκτικά σε, φυσιολογικά, θανατηφόρα επίπεδα pH. Το σύστημα απόκρισης σε όξινη καταπόνηση της *L. monocytogenes* θα μπορούσε να ενεργοποιηθεί σε όξινα τρόφιμα, όταν εκτίθενται σε γαστρικό υγρό ή εντός του φαγώσιμου των μακροφάγων (Gahan και Hill, 1999). Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του *L. monocytogenes* είναι μεταξύ 30°C και 37°C, και οποιαδήποτε θερμοκρασία πάνω από αυτό το βέλτιστο εύρος αναμένεται να ασκήσει μία καταπόνηση (Petran και Zottola, 1989). Όταν τα μικροβιακά κύτταρα εκτίθενται σε θερμοκρασίες υψηλότερες των βέλτιστων για την ανάπτυξή τους, ακόμη και για μικρές χρονικές περιόδους, ενεργοποιούνται μοναδικοί μηχανισμοί απόκρισης εντός των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της σύνθεσης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Lindquist, 1986; Knabel et al, 1990.). Οι Pagan et al. (1997) έχουν αναφέρει επτά φορές αύξηση στην θερμο-ανοχή της *L. monocytogenes* όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 45°C για 180 λεπτά. Η έκταση της έκθεσης σε θερμοκρασία πάνω από βέλτιστα επίπεδα, και το μέσο ανάπτυξης στην οποία εκτίθενται τα κύτταρα έχουν αναφερθεί να επηρεάζουν την έκταση της παρατηρούμενης θερμο-ανοχής (Linton et al, 1990; Serghelidis et Abraham, 2009).

Μικροβιακή προσαρμογή στο στρες προκαλεί επίσης εκτεταμένη ανοχή σε πολλούς άλλους θανατηφόρους στρεσογόνους παράγοντες. Αυτό έχει ονομαστεί «διασταυρούμενη προστασία» (cross-protection) (Begley et al., 2002). Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν διασταυρούμενη προστασία ως στρατηγική

άμυνας κατά των ακραίων καταπονήσεων των διαφόρων τεχνικών συντήρησης των τροφίμων (Rodriguez-Romo και Yousef, 2005). Εκτός από το ATR έχει επίσης δειχθεί να δημιουργούν μία διασταυρούμενη προστασία έναντι σε θερμικές και οσμωτικές καταπονήσεις. Ο Foster (2000), έχει αναφέρει ότι η επαγωγή πρωτεϊνών του όξινου στρες προστατεύει τα μικροβιακά κύτταρα έναντι θανατηφόρων πρωτεϊνών οξέος ή άλλες καταπονήσεις, όπως η υψηλή θερμοκρασία, οξειδωτική βλάβη και υψηλή ωσμωτικότητα. Η προσαρμοσμένη σε οξύ *L. monocytogenes* (pH 5.5, 2 ώρες) είχε μια αυξημένη απόκριση έναντι θερμικής (52°C) και οσμωτικής (25-30% NaCl) καταπόνησης καθώς και έναντι στρες αλκοόλης (15%) (Koutsoumanis et al., 2003)

Ο *L. monocytogenes* είναι συνήθως ανθεκτικός σε μικρές αλλαγές σε μια συγκεκριμένη περιβαλλοντική παράμετρο, αλλά με την παρουσία των πιο σημαντικών αλλαγών συμβαίνει η επαγωγή του συμπλόκου των αποκρίσεων στρες η οποία κατευθύνεται προς την επιβίωση και όχι προς την ανάπτυξη (Faleiro et al., 2003). Η συγκεκριμένη απόκριση επιτρέπει στο βακτήριο να μεταβάλλει τη γονιδιακή του έκφραση (Liu, 2008). Αυτό οδηγεί σε μεταβολές στις πρωτεΐνες που συντίθενται επιτρέποντας στον οργανισμό να επιβιώσει σε σκληρά οσμωτικά στρεσαρισμένα περιβάλλοντα για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα. Συνδέεται κυρίως με την επιβίωση σε κάποιες από τις αποκρίσεις στρες οι οποίες μπορούν επίσης να αυξήσουν την τοξικότητα του οργανισμού. Αυτή η αύξηση στην παθογένεια, η οποία επάγεται μετά από έκθεση σε μία ποικιλία αποκρίσεων στρες, μπορεί επίσης να αυξήσει τη βακτηριακή αντοχή στις άμυνες του ξενιστή (Gahan et al., 2001). Αυτές οι αποκρίσεις, επιτρέπουν στον μικροοργανισμό να μολύνει τον ξενιστή και ουσιαστικά τον ευνοούν να επιβιώσει στις σκληρές συνθήκες κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας της τροφής

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* έχει αναπτύξει διάφορους κυτταρικούς μηχανισμούς για την προσαρμογή και την επιβίωση στα όξινα περιβάλλοντα προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόσταση του pH. Προσαρμογή της *L. monocytogenes* σε όξινα περιβάλλοντα περιλαμβάνει μηχανισμούς που διατηρούν ενδοκυτταρική ομοιοστασία pH με τους παρακάτω τρόπους: κατευθύνοντας ιόντα H⁺ έξω από το κύτταρο (π.χ., FOF1 ATPάσες, ή κατιόν / H⁺

αντιμεταφορείς), κατανάλωση εσωτερικής H⁺ μέσω αντιδράσεων αποκαρβοξυλίωσης (π.χ., γλουταμικό, λυσίνη αποκαρβοξυλάσες) παραγωγή των ιόντων αμμωνίου (π.χ., αμινο deiminases οξύ) ή μακρομόριο από πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Ivy, M. Wiedmann, et K. J. Boor). Η προσαρμοστική απόκριση λοιπόν, που επάγει αντίδραση των μικροοργανισμών στην όξινη καταπόνηση (acid tolerance response-ATR), περιλαμβάνει απόκτηση όξινης αντοχής μετά από σύντομη έκθεση σε ήπια όξινες συνθήκες. Η ενεργοποίηση αυτού του συστήματος έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή πρωτεϊνών όξινης καταπόνησης (Acid Shock Proteins-ASPs) όταν υποβάλλεται σε συνθήκες έντονης καταπόνησης ή ακόμα και σε θανατηφόρο pH (Foster, 1991; Foster et al., 1994; Kroll et Patchett, 1992; O'Driscoll et al., 1997). Η ανθεκτικότητα στην όξινη καταπόνηση της *L. monocytogenes* ήταν το αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης κατά τη διάρκεια της προηγούμενης δεκαετίας, με πολλές μελέτες να συσχετίζουν την ανθεκτικότητα στη καταπόνηση με την παθογένεια του μικροοργανισμού (Conte et al., 2000, 2002, Gahan et Hill, 1999). Επιπλέον η *L. monocytogenes* όχι μόνο επιζεί της όξινης καταπόνησης αλλά σε χαμηλό pH τροφών ή κατά τη διάρκεια της γαστρικής διέλευσης ή μετά από έκθεση σε λιπαρά οξέα στο έντερο, και τελικά στα φαγосώματα των μακροφάγων, απαιτεί μια πτώση του pH, ώστε να ενεργοποιήσει την αιμολυσίνη, την τοξίνη που επιτρέπει την διαφυγή του από το φαγόσωμα.. Εκτεθειμένος σε συνθήκες στρες ή σε οξύ τα κύτταρα είναι πολύ πιο ανεκτικά σε κανονικά θανατηφόρα επίπεδα pH. Μόλις καταναλωθεί λοιπόν, ο *L. monocytogenes* πρέπει να επιβιώσει στο γαστρικό πέρασμα για την επίτευξη του εντερικού επιθηλιακού φραγμού κυττάρων, όπου μπορεί να εισβάλει και στη συνέχεια να διαδοθεί συστηματικά. Το ανθρώπινο pH κυμαίνεται στο στομάχι από 1-3 ή υψηλότερη (άνω των 6,0) μετά την κατανάλωση των τροφίμων. Ο *L. monocytogenes* χρησιμοποιεί επίσης το σύστημα της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού (GAD) για να επιβιώσει σε στρες οξέος. Το σύστημα GAD αποτελείται από τρία γονίδια *gadA*, *gadB* και *gadC*. Τα *gadA* και *gadB* γονίδια κωδικοποιούν δύο αποκαρβοξυλάσες γλουταμινικού και το *gadC* γονίδιο κωδικοποιεί μια γλουταμικό-γ-αμινοβουτυρικό (GABA) αντιμεταφορέα (Cotter et al., 2001). Ένας ειδικός μεταφορέα παίρνει το γλουταμινικό από το κύτταρο και στη συνέχεια η αποκαρβοξυλίωση συμβαίνει στο κυτταρόπλασμα.

Στη συνέχεια παράγεται γ-αμινοβουτυρικό με κατανάλωση πρωτονίου και εξάγεται από το κύτταρο μέσω ενός αντιμεταφορέα που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη. Λόγω της απώλειας πρωτονίων παρατηρείται αυξημένο κυτταροπλασματικό pH (Waterman, 1998). Ο ρόλος της GAD συστήματος στην αντοχή σε οξύ του *L. monocytogenes* κατά τη γαστρική διέλευση έχει μελετηθεί από Cotter et al. (2001), και βρήκαν ότι η προσθήκη του γλουταμινικού αύξησε την επιβίωση του άγριου στελέχους στο γαστρικό υγρό. Κατάργηση των *gadA*, *gadB* και *gadC* γονιδίων οδήγησε σε αυξημένη ευαισθησία έναντι χαμηλό pH. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν τη σημασία του GAD συστήματος στην αντοχή σε οξύ.

Ο Koutsoumanis et al. (2003) εξέτασαν στη στατική φάση του *L. monocytogenes* κύτταρα που αναπτύσσονται σε μέσο χωρίς γλυκόζη και μέσο που περιέχει γλυκόζη όταν εκτίθενται σε διάφορους στρεσογόνους παράγοντες όπως οξύ (pH 4,0, 7,0), οσμωτική πίεση (ρυθμιζόμενη με προσθήκη 10,5 έως 20,5% NaCl) και θερμοκρασία (-5 ° C έως 50 ° C) και όταν εκτίθενται περαιτέρω σε pH 3.5. Η ανάπτυξη του *L. monocytogenes* σε παρουσία γλυκόζης οδήγησε σε αυξημένη επιβίωση του παθογόνου σε pH 3.5. Σε υποθανάτιο στρες εκτός από όξινα , δηλαδή, οσμωτική, τη θερμότητα, και η χαμηλή θερμοκρασία , δε φαίνεται να επηρεάζει την απόκριση στο οξύ.

1.15 Θερμικό στρες

Θερμική επεξεργασία είναι μία από τις παλαιότερες και πιο κοινές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Οι μικροοργανισμοί εκτίθενται σε θερμικό στρες κατά τη διάρκεια της

επεξεργασίας τροφίμων. Προσδιορισμός της κατάλληλης θερμικής επεξεργασίας είναι ένα κρίσιμο ζήτημα εάν ένας μικροοργανισμός είναι αδρανοποιημένο ή καθίσταται ανθεκτικό στο στρες θερμοκρασίας. Υποθανάτιο θερμικό στρες μπορεί να οριστεί ως ένα στρες όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε παραπάνω από τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης (αλλά κάτω από θανατηφόρα) (Rodriguez-Romo και Yousef, 2005). Όταν τα μικροβιακά κύτταρα που εκτίθενται σε θερμοκρασίες πάνω από βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης, ακόμη και για μικρές χρονικές περιόδους, οι μοναδικές φυσιολογικές αποκρίσεις ενεργοποιούνται εντός των κυττάρων (Lindquist, 1986; Knabel et al, 1990). Η θερμική αντίσταση του *L. monocytogenes* σε τρόφιμα ποικίλει (Casadei et al, 1998; Kenney et Beuchat, 2004; Mackey et al, 1990). Οι Doyle et al. (2001) έχουν εξετάσει διεξοδικά θερμική αντίσταση στο *L. monocytogenes* σε μέσα καλλιέργειας και τα τρόφιμα. Τα στοιχεία υποδηλώνουν έντονα ότι θερμική αντίσταση της *L. monocytogenes* εξαρτάται από την ηλικία της καλλιέργειας, τις συνθήκες ανάπτυξης, μέσα αποκατάστασης, και τα χαρακτηριστικά των τροφών (περιεκτικότητα σε αλάτι, aw, η οξύτητα, η παρουσία των αναστολέων). Οι μικροοργανισμοί είναι γνωστό ότι αυξάνουν την θερμο-ανοχή τους όταν εκτίθενται σε μια ποικιλία περιβαλλοντικών παραγόντων πίεσης όπως υποθανάτιο θερμικό σοκ, οσμωτικό στρες, έλλειψη θρεπτικών συστατικών, την έκθεση σε οξύ, αλκαλική κατεργασία, αιθανόλη ή υπεροξείδιο του υδρογόνου (Farber και Brown, 1990; Jorgensen et al, 1995; Lou et Yousef, 2007; Mazzotta και Gombas, 2001).

Η απόκριση θερμικού σοκ των βακτηριδίων είναι μια παγκόσμια προστατευτική απόκριση έναντι του θερμικού στρες. Αυτή η απόκριση καταλήγει σε μια προσωρινή επαγωγή των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSPs), τα οποία προστατεύουν τα κύτταρα από βλάβες θερμότητας ή άλλους στρεσογόνους παράγοντες. Όλοι οι μικροοργανισμοί έχουν εξεταστεί ότι παράγουν πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα hsp70 και hsp90, οικογένειες γονιδίων σε απόκριση σε υψηλές θερμοκρασίες. Αυτές οι πρωτεΐνες εξαιρετικά συντηρημένες μεταξύ προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών και την αύξηση της προστασίας σε μεταγενέστερους στρεσογόνους παράγοντες (Lindquist, 1986; Lindquist et Craig, 1988).

1.16 Όξινο στρες

Η οξίνιση των τροφίμων είναι μια από τις κοινές μεθόδους συντήρησης των τροφίμων που χρησιμοποιείται σε όλο τον κόσμο. Αυτό επιτυγχάνεται είτε μέσω ζύμωσης ή την προσθήκη ειδικών συντηρητικών στα τρόφιμα όπως οξικό οξύ, προπιονικό οξύ και γαλακτικό οξύ. Το ασθενές οξύ σε αδιάστατη μορφή μπορεί να εισέλθει στα μικροβιακά κύτταρα, και μέσα στο κυτταρόπλασμα να μειώσει το ενδοκυτταρικό pH έτσι κατά συνέπεια διαταράσσονται οι μεταβολικές δραστηριότητες. Γενικά, οι μικροοργανισμοί διατηρούν το ενδοκυτταρικό τους pH μέσω τους μηχανισμού ομοιόστασης του pH (pH homeostasis) λόγω της μεταφοράς πρωτονίων διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Στους αερόβιους οργανισμούς, η ενεργή μεταφορά των H⁺ συνδέεται με την μεταφορά των ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα. Αντίθετα, τα αναερόβια βακτήρια επιτυγχάνουν τη μεταφορά των H⁺ με την βοήθεια των μορίων H⁺ - ATPασης, καταναλώνοντας παράλληλα ενέργεια από την υδρόλυση ATP (Gandhi and Chikindas., 2007). Η *L. monocytogenes*, ως προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, μπορεί να χρησιμοποιήσει και τις δύο αυτές διαδικασίες για να διατηρήσει σταθερό το pH (Shabala et al., 2002). Η αντίδραση των μικροοργανισμών στην όξινη καταπόνηση (ATR) είναι μια προστατευτική απόκριση επαγόμενη σε μικροοργανισμούς κατά του όξινου στρες (Gahan et al., 1996). Η μικροβιακή απόκριση στο όξινο στρες περιλαμβάνει αλλαγές στην σύνθεση της μεμβράνης, αύξηση των πρωτονίων εκροής, αύξηση σε αμινοξέα καταβολισμού και επαγωγή των ενζύμων επιδιόρθωσης του DNA (Beales, 2004; Yousef et Courtney, 2003).

Οι διαφορές στο ATR μεταξύ διαφόρων βακτηρίων και μεταξύ εκθετικής και στατικής κυτταρικής φάσης έχουν αναφερθεί (Hartke et al, 1996; Jordan et al, 1999). Ενδοκυτταρικές ή εξωκυτταρικές διακυμάνσεις του pH μπορεί να είναι ένα σήμα για την επαγωγή του στρες στο οξύ ή πρωτεϊνών προσαρμογής στο στρες. Εξωτερικές ή περιπλασμικές πρωτεΐνες μπορούν επίσης να ανιχνεύονται από πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες στην μεμβράνη (Foster, 1999).

Εσωτερικές διακυμάνσεις pH μπορεί επίσης να επηρεάσουν την έκφραση γονιδίων ή διαμορφώνουν ένα ρυθμιστικό στοιχείο που ελέγχει την έκφραση γονιδίου.

Ο *L. monocytogenes* αποκρίνεται και επιβιώνει σε συνθήκες χαμηλού pH χρησιμοποιώντας μία σειρά μηχανισμών προσαρμογής στο στρες. Η έκθεση σε ήπιες συνθήκες όξινου στρες (pH 5,5) επάγει την απόκριση ανοχής οξέος (ATR) (O'Driscoll et al., 1996). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, έκθεση του *L. monocytogenes* σε όξινα pH μπορεί να προκαλέσει διάφορες μεταβολές στο κύτταρο. Οι Phan-Thanh and Mahousin (1999) παρατήρησαν αύξηση στην παραγωγή ορισμένων πρωτεϊνών, όπως η GroEL, η ATP – συνθάση και διάφοροι μεταγραφικοί ρυθμιστές, σε βακτήρια που εκτέθηκαν σε όξινες συνθήκες καταπόνησης.

Όλοι οι παθογόνοι μικροοργανισμοί έρχονται αντιμέτωποι με διάφορα οργανικά και ανόργανα οξέα στα τρόφιμα ή στο γαστρεντερικό σύστημα και τα κύτταρα του ξενιστή. Αυτά τα οξέα έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη και επιβίωση των μικροοργανισμών. Η όξινη αυτή καταπόνηση προκαλεί διάφορες μεταβολές στη δομή και τις λειτουργίες των κυττάρων όπως για παράδειγμα αλλαγή στη σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης, αύξηση της ροής των πρωτονίων και του καταβολισμού των αμινοξέων, παραγωγή DNA – διορθωτικών ενζύμων κ.α. Η αντίδραση αυτή των μικροοργανισμών στην όξινη καταπόνηση (Acid Tolerance Response, ATR) είναι ένα φαινόμενο κατά το οποίο η έκθεση σε μετρίως χαμηλά pH αυξάνει την σύνθεση των πρωτεϊνών που βοηθούν την επιβίωση των μικροοργανισμών σε πολύ υψηλές οξύτητες (Yousef and Courtney, 2003). Η ATR διαφέρει μεταξύ των κυττάρων που βρίσκονται στην εκθετική και την στατική φάση αλλά και μεταξύ των διαφόρων ειδών βακτηρίων.

Παράλληλα με τα παραπάνω, στον *L. monocytogenes* έχει ταυτοποιηθεί ένα ρυθμιστικό σύστημα, το οποίο βασίζεται στα γονίδια *lisR* και *lisK*. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν ένα ρυθμιστικό παράγοντα, τον σ^B και την ιστιδίνη – κινάση, αντίστοιχα. Το σύστημα αυτό έχει την ικανότητα να αντιλαμβάνεται τις μεταβολές στο περιβάλλον του κυττάρου, όπως το χαμηλό pH, με τη βοήθεια της ιστιδίνης – κινάσης και εν συνεχεία να αυξάνει την έκφραση του γονιδιώματος με τη βοήθεια του ρυθμιστικού παράγοντα (Gandhi and Chikindas., 2007; Gahan and Hill, 2003).

1.17 Τεχνολογία τροφίμων- Δομή τροφίμων

Η Τεχνολογία τροφίμων μπορεί να οριστεί σύμφωνα με Aguilera & Stanley (1999) ως μια ελεγχόμενη προσπάθεια για τη διατήρηση, τη μετατροπή, τη δημιουργία ή την καταστροφή της δομής ενός τροφίμου που έχει δημιουργηθεί από τη φύση ή την επεξεργασία του. Τον τελευταίο αιώνα η βιομηχανία τροφίμων είδε τη γέννηση και την ανάπτυξη ως προς την επεξεργασία των τροφίμων που είναι διαθέσιμα στους καταναλωτές. Μηχανικοί και τεχνολόγοι τροφίμων πέτυχαν στην παραγωγή ασφαλών, διαφοροποιημένων ως προς την δομή και καλής ποιότητας τρόφιμα σε μεγάλες ποσότητες ώστε να τροφοδοτήσει τους καταναλωτές. Μπορούμε να πούμε ότι η σημαντική πρόοδος στην τεχνολογία των τροφίμων κατά τη διάρκεια του 20ου αιώνα, προήλθε από τη μεταφορά και προσαρμογή των γνώσεων από συναφείς τομείς, όπως τη χημεία και τη μηχανική τροφίμων. Ο αντίκτυπος ήταν σε μεγάλο βαθμό στην επεξεργασία των τροφίμων ή σε μακροσκοπικό επίπεδο, μέσω της προσαρμογής της λειτουργίας της μονάδας και το σχεδιασμό του εξοπλισμού διεργασιών για τη μετατροπή και τη διατήρηση τροφίμων, κάτι που ποτέ δεν έγινε στο παρελθόν. Περαιτέρω βελτιώσεις στην ποιότητα των τροφίμων καθώς και η δημιουργία νέων προϊόντων για να ικανοποιήσει τις απαιτήσεις των καταναλωτών, βασίστηκε σε μεγάλο βαθμό στις παρεμβάσεις στο μικροσκοπικό επίπεδο.

1.18 Δομή Τροφίμων και ανάπτυξη μικροοργανισμών

Τα τρόφιμα μπορεί να χωριστούν στα υγρά και στα δομημένα προϊόντα. Σε υγρά τρόφιμα οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται πλαγκτονικά και η μεταφορά των θρεπτικών συστατικών και των μεταβολιτών εκτός του κυττάρου συμβαίνει τόσο με διάχυση όσο και με μεταφορά, η οποία οδηγεί σε ένα ομοιογενές περιβάλλον (Wilson et al., 2002).

Τα τρόφιμα είναι σύνθετα υλικά των οποίων οι μακροσκοπικές ιδιότητες προκύπτουν από το συνδυασμό των χαρακτηριστικών μικροδομής σε κλίμακα μήκους 1 nm- 100 mm (Aguilera, 2005). Εκτός από την επίδρασή της στην λειτουργικότητα (π.χ.,υφής),η μικροδομή των τροφίμων παίζει επίσης έναν σημαντικό ρόλο στη συμπεριφορά και την πιθανή ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

Έτσι σημαντικός παράγοντας στην κατανομή του νερού σε ένα τρόφιμο είναι η δομή του (Wilson et al, 2002; Brocklehurst, 2003). Τυπικά, μια διάκριση γίνεται μεταξύ υγρών τροφίμων και δομημένων, όπου στα υγρά οι θρεπτικές ουσίες και οι μεταβολίτες είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα και έχουμε πλαγκτονική ανάπτυξη(Brocklehurst et al, 1997)

Οι δομικές ιδιότητες του τροφίμου σε μικροσκοπική κλίμακα επηρεάζει την μικροβιολογική ανάπτυξη των μικροοργανισμών όπου παρατηρείται κυρίως ανάπτυξη στην υδατική περιοχή του τροφίμου.

Η πλειονότητα των μοντέλων πρόβλεψης αναπτύσσεται με βάση πειράματα σε υγρά μέσα. Έτσι τα μοντέλα που βασίζονται σε υγρά πειράματα μπορούν να προβλέψουν με ακρίβεια τη μικροβιακή συμπεριφορά προσομοιάζοντας υγρά τρόφιμα ή γαλακτώματα ελαίου σε νερό (Wilson et al., 2002). Ωστόσο, πολλά τρόφιμα δεν είναι υγρά, αλλά παρουσιάζουν ένα περιβάλλον που είναι ετερογενές σε φυσική δομή και χημική σύσταση (Fleet, 1999). Η συμπεριφορά

των μικροοργανισμών δεν καθορίζεται μόνο από τη χημική σύνθεση (π.χ., pH, aw, συντηρητικά) και συνθήκες συντήρησης του προϊόντος (π.χ., θερμοκρασία), αλλά και από τη δομή του.

Όσον αφορά στα δομημένα τρόφιμα (π.χ., γαλακτώματα, πηκτές, στερεά τρόφιμα), οι μικροοργανισμοί ακινητοποιούνται και περιορίζεται η αύξηση των αποικιών. Ποιοτικές και ποσοτικές μελέτες έχουν κυρίως επικεντρωθεί στη δυναμική της ανάπτυξης και έχουν ως αποτέλεσμα την γενική παραδοχή ότι η δομή πρέπει να θεωρείται ως ένας πρόσθετος παράγοντας στρες-καταπόνηση και έτσι, οδηγεί σε χαμηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης των μικροοργανισμών (Brocklehurst et al, 1997, Stecchini et al, 1998; Skandamis et al, 2000; Wilson et al, 2002; Meldrum et al, 2003)

1.19 Ζελατίνη

1.19.1 Δομή

Η ζελατίνη είναι ένα προϊόν πρωτεϊνικής φύσης το οποίο προκύπτει από τη μερική υδρόλυση του κολλαγόνου του δέρματος, των οστών και συνδετικών ιστών των ζώων. Η ζωική αυτή πρωτεΐνη δομείται από όλα τα αμινοξέα εκτός από την τρυπτοφάνη. Κατά την προσθήκη κρύου νερού, η ζελατίνη απορροφά νερό και διογκώνεται. Κατά την ενυδάτωση αυτή, τα μόρια της ζελατίνης τα οποία βρίσκονται υπό μορφή ζικ-ζακ πολυπεπτιδικών αλυσίδων ενώνονται μεταξύ τους προς σχηματισμό χωροπλέγματος. Το αναρροφούμενο νερό παγιδεύεται και ακινητοποιείται σε χωροπλέγμα όπως θα συνέβαινε στην περίπτωση ενός σφουγγαριού. Ένα μέρος του αναρροφούμενου νερού συγκρατείται από τα μόρια της ζελατίνης με δεσμούς υδρογόνου. Κατά τη θέρμανση της ενυδατωμένης ζελατίνης το σύστημα υγροποιείται μετατρέπόμενο σε κολλοειδές αιώρημα στερεού σε υγρό. Κατά την ψύξη του αιωρήματος σχηματίζεται η πηκτή.

1.19.2 Χρήση ζελατίνης

Η ζελατίνη χρησιμοποιείται ευρέως από τη βιομηχανία των τροφίμων ως παράγοντας πήξης, σταθεροποιητής και παράγοντας διαύγασης. Η ζελατίνη είναι επίσης ένα εμπορικό συστατικό τροφίμων που χρησιμοποιούνται σε ένα ευρύ φάσμα των εφαρμογών τροφίμων, όπως γαλακτοκομικά προϊόντα, γιαούρτι, επιδόρπια, τα προϊόντα με βάση το κρέας (κονσέρβες κρέατος), είδη ζαχαροπλαστικής και προϊόντα αρτοποιίας ζελέδες, παγωτά, σουπες, φρουτοχυμοί, μαρμελάδες, κρεμώδη τυριά, μαργαρίνη, κρασιά. Επιπλέον χρησιμοποιείται σε προϊόντα με μειωμένη λιποπεριεκτικότητα ώστε να προσδώσει στο προϊόν πλούσια υφή όμοια με του λίπους, χωρίς όμως να επιβαρύνει το τρόφιμο με τις θερμίδες του. Στην περίπτωση των λευκών οίνων, χρησιμοποιείται για τη διαύγασή τους από πρωτεϊνικά θολώματα. Επιπρόσθετα, τυχαίνει εφαρμογών σε φαρμακευτικά προϊόντα και σε καλλυντικά.

Η ζελατίνη είναι ένα βιοπολυμερές που είναι διαδεδομένο και χρησιμοποιείται σαν ένας παράγοντας πηκτωματοποίησης σε εφαρμογές τροφίμων. (Wilson et al., 2002). Η χρήση της στηρίζεται στην ικανότητα της να δημιουργεί δυνατές και ελαστικές πηκτές σε μικρές συγκεντρώσεις και έχει το πλεονέκτημα να τήκεται στους 37 °C. Επίσης το χαμηλότερο σημείο τήξεως διευκολύνει τη μικροβιακή δειγματοληψία. Η ζελατίνη ή άγαρ μπορεί να προστίθεται σε ένα υγρό μέσο και να μιμείται τρόφιμα όπως πατέ και αποβουτυρωμένου γάλακτος τυριά (Wilson et al., 2002) και τα υπάρχοντα μοντέλα μπορούν να προσαρμοστούν με βάση αυτά τα δεδομένα. Η πηκτωματοποίηση λαμβάνει χώρα με φυσική διασταυρούμενη σύνδεση, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό ζωνών σύνδεσης και τέλος ένα τρισδιάστατο διακλαδισμένο δίκτυο (Haug et al., 2004).

Οι πηκτές ζελατίνης είναι τυπικά πηκτώματα εκτός ισορροπίας, που σημαίνει ότι η αντοχή τους ολοένα αυξάνεται με τον χρόνο με την αναδιοργάνωση ή την ανάπτυξη των κομβικών ζωνών στο δίκτυο της πηκτής.

Στο πείραμα επιλέχθηκε ζελατίνη ως το μέσο στερεοποίησεως επειδή έχει ένα χαμηλό σημείο τήξεως (37o C) σε σύγκριση με το άγαρ (με ένα σημείο τήξης

από 80 έως 95-C). Με τον τρόπο αυτό, ήταν δυνατό να εμβολιαστούν τα δείγματα με *L. monocytogenes* σε μία σχετικά χαμηλή θερμοκρασία χωρίς απενεργοποίηση ή καταπόνηση των βακτηριακών κυττάρων. Η δυνατότητα επανάτηξης της ζελατίνης σε χαμηλότερη θερμοκρασία, σε σύγκριση με ένα μέσο στερεοποιημένο με άγαρ, ήταν ένα πρόσθετο πλεονέκτημα διότι ήταν πιο εύκολο να ληφθεί ένα τετηγμένο δείγμα για περαιτέρω ανάλυση.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Στελέχη μικροοργανισμών

Τα στελέχη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* ελήφθησαν από την μικροβιακή συλλογή του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω στελέχη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* α) C5 (PL1) και β) 6179 (PL2), απομονωμένα από γαλακτοκομικό περιβάλλον και από τυρί αντίστοιχα. Τα στελέχη ανήκουν στους ορότυπους 4b και 1/2a αντίστοιχα και κωδικοποιούνται στην παρούσα μελέτη ως PL1 και PL2.

2.2 Προετοιμασία εμβολίου

Όλα τα στελέχη ήταν αποθηκευμένα σε θρεπτικό υλικό Tryptone Broth Agar TSBYE με 20% V/V γλυκερόλη στους -20°C και ανακαλλιεργούνταν ανά έξι μήνες. Για μικρού μήκους συντήρηση, πραγματοποιούνταν γραμμική εξάπλωση (streaking) σε τρυβλία Tryptone Soy Agar με 0,6% w/V Yeast Extract (LabM, LAB011), μετά από δύο ανανεώσεις (24h και 18h αντίστοιχα) σε TSBYE (βλ ανανέωση μικροοργανισμών). Τα τρυβλία χρησιμοποιούνταν και για τον έλεγχο καθαρότητας του μικροοργανισμού και φυλάσσονταν σε θερμοκρασία 2-4°C και χρησιμοποιούνταν έως τρεις εβδομάδες .

Για την προετοιμασία του εμβολίου προηγείται η φάση ανανέωσης των μικροοργανισμών και ο καθαρισμός του εμβολίου. Η ανανέωση των μικροοργανισμών γίνεται προκειμένου οι μικροοργανισμοί να ανακτήσουν τη ζωτικότητα τους και να καταστούν άμεσα έτοιμοι για ανάπτυξη. Συνήθως περιλαμβάνει μία ή δύο ανακαλλιέργειες σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα για 24h και 18h αντίστοιχα σε κατάλληλη θερμοκρασία ανάπτυξης. Στη συνέχεια, ο καθαρισμός του εμβολίου σκοπό έχει την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και όλων των μικροβιακών μεταβολιτών που υφίστανται στο μέσο.

Συγκεκριμένα, με τη βοήθεια βακτηριακού κρίκου, λαμβάνεται μονή βακτηριακή αποικία και υπό ασηπτικές συνθήκες μεταφέρεται σε 10ml αποστειρωμένο Tryptone Soy Broth με Yeast Extract (0,6% w/V) (LabM, LAB004), TSBYE. Ακολουθεί καλή ανάδευση σε αναδευτήρα Vortex και επώαση, για 24h στους 30°C (πρώτη ανανέωση). Στη συνέχεια όγκος 100ml από την πρώτη ανανέωση μεταφέρεται υπό ασηπτικές συνθήκες σε 10ml νέου αποστειρωμένου TSBYE. Ακολουθεί καλή ανάδευση σε αναδευτήρα Vortex και επώαση, για 18h στους 30°C (δεύτερη ανανέωση).

Για τον καθαρισμό του εμβολίου η καλλιέργεια (από τη δεύτερη ανανέωση) μεταφέρεται σε σωλήνα Falcon χωρητικότητας 15ml και φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία 4°C με ταχύτητα 3600 rpm για χρόνο 15'. Ακολουθεί απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 10ml ¼ Ringer's solution. Το παραπάνω βήμα επαναλαμβάνεται δυο φορές και τελικά επαναδιαλύεται το ίζημα σε επιθυμητό όγκο ¼ Ringer's solution.

2.3 Δειγματοληψία

Δειγματοληψία πραγματοποιούταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ανάλογα με τη θερμοκρασία συντήρησης. Η διαδικασία της δειγματοληψίας περιελάμβανε την παραλαβή του εκάστοτε δείγματος, την πραγματοποίηση δεκαδικών αραιώσεων σε ¼ Ringer's solution και κατόπιν την εφαρμογή τεχνικής της επιφανειακής εξάπλωσης σε τριβλία με θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE. Η καταμέτρηση των αποικιών *Listeria monocytogenes* πραγματοποιούνταν μετά από επώαση των τρυβλίων στους 30°C για 48h.

2.4 Έκθεση σε συνθήκες όξινης καταπόνησης

Η δοκιμή της όξινης καταπόνησης πραγματοποιήθηκε σε σωλήνες Falcon χωρητικότητας 50ml, που περιείχαν 10-20ml αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό TSBYE του οποίου το pH (2.0) ρυθμίστηκε μετά την αποστείρωση με χρήση HCl (6N), υπό ασηπτικές συνθήκες. Η τιμή του pH προσδιορίστηκε με τη χρήση ψηφιακού πεχάμετρου. Η μέτρηση γινόταν με εμβάπτιση του ηλεκτροδίου.

Για κάθε δείγμα συγκεκριμένος όγκος προστίθετο σε κάθε falcon και ακολουθούσε επώαση στους 37° C για το επιθυμητό χρονικό διάστημα. Η καταμέτρηση των επιβιωσάντων μικροοργανισμών μετά την υποβολή σε όξινη καταπόνηση γινόταν με επίστρωση σε τρυβλία TSAYE.

2.5 Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων

Επισημαίνεται ότι κατά την δειγματοληψία για τον προσδιορισμό του μικροβιακού φορτίου χρειάζεται η διαδικασία του διαχωρισμού των βακτηρίων ώστε όταν καλλιεργηθούν σε ένα στερεό θρεπτικό υλικό, να σχηματίσουν μεμονωμένες και ευκρινείς αποικίες. Έτσι σε κάθε πείραμα και για κάθε δειγματοληψία ακολουθούσαμε την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων.

- Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προσθέτονται 9ml ισοτονικού διαλύματος Ringer και επισημαίνουμε τους συντελεστές αραιώσης.
- Μεταφέρουμε ασηπτικά 1ml από το erpendorf tube (πείραμα 1^ο) και από duran (πείραμα 2^ο)
- Αναδεύουμε με περιστροφικό αναδευτήρα (vortex) προκειμένου να επιτύχουμε επαρκή διασπορά .
- Με τον ίδιο τρόπο συνεχίζουμε και με τους υπόλοιπους δοκιμαστικούς σωλήνες μέχρι την αραιώση που θέλουμε.

2.6 Διαδικασία προσδιορισμού άγνωστων αποικιών

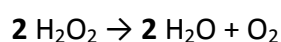
2.6.1 Δοκιμή οξειδάσης

Η αρχή της δοκιμής βασίζεται στην παρουσία ενός ενδοκυττάρου συστήματος οξειδάσης κυτοχρώματος, το οποίο ενεργοποιεί την οξείδωση του ανηγμένου κυτοχρώματος από το μοριακό οξυγόνο. Το κυτόχρωμα χρησιμεύει ως δέκτης ηλεκτρονίων στο τελικό στάδιο του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων. Οι μικροοργανισμοί που παράγουν το ένζυμο της οξειδάσης, το οποίο παρουσία ατμοσφαιρικού οξυγόνου, του κυτοχρώματος c και του αντιδραστήριου οξειδάσης (μονοϋδρωχλωρική p- αμινοδιμεθυλανιλίνη), οξειδώνουν το αντιδραστήριο για το σχηματισμό μιας έγχρωμης ένωσης, της ινδοφαινόλης. Η αντίδραση γίνεται αντιληπτή, συνήθως εντός 10 δευτερολέπτων, με την παραγωγή βαθύ μωβ χρώματος (MacFaddin, 2000).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα strips, στην άκρη των οποίων υπάρχει θέση εμποτισμένη με κατάλληλο αντιδραστήριο. Στη θέση αυτή μεταφερόταν με τη βοήθεια μίας αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας, υπό ασηπτικές συνθήκες, ποσότητα κυττάρων από την άγνωστη αποικία. Το δείγμα ήταν θετικό στην αντίδραση της οξειδάσης όταν γινόταν αντιληπτή η μεταβολή του χρώματος από κιτρινωπό σε μπλε, κάτι που υποδείκνυε την παρουσία τα οξειδάσης. Σε περίπτωση που το παραγόμενο χρώμα ήταν κιτρινωπό ή καφέ, το δείγμα κρινόταν ως αρνητικό στην αντίδραση της οξειδάσης.

2.6.2 Δοκιμή καταλάσης

Τα περισσότερα αερόβια βακτήρια παράγουν το ένζυμο, καταλάση, το οποίο αποικοδομεί τα τοξικά υπεροξειδία και με αυτό τον τρόπο ο μικροοργανισμός αυτοπροστατεύεται. Η αρχή της δοκιμής βασίζεται στη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ύδωρ και οξυγόνο σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Όταν η καλλιέργεια (συνήθως μια αποικία) αναμιγνύεται με διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου, το ένζυμο που είναι παρόν στους θετικούς στην καταλάση μικροοργανισμούς, μπορεί να γίνει αντιληπτό με την απελευθέρωση οξυγόνου με τη μορφή φυσαλίδων (αφρισμός). Η απουσία παραγωγής φυσαλίδων εντός μερικών δευτερολέπτων δείχνει αρνητικούς στην καταλάση μικροοργανισμούς (Bell, 2005). Η διαδικασία είναι η ακόλουθη: με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα μεταφέρεται τμήμα της υπό εξέταση αποικία σε μία-δύο σταγόνες υπεροξειδίου του υδρογόνου, οι οποίες έχουν σχηματιστεί στην επιφάνεια τριβλίου με τη βοήθεια πιπέττας. Θεωρείται θετική, η αποικία στην οποία θα παρατηρηθούν φυσαλίδες.

2.6.3 Χρώση κατά Gram

Η χρώση των κυττάρων κατά Gram αποτελεί ένα από τους σημαντικότερους ταξινομικούς παράγοντες των μικροοργανισμών. Ανήκει στις λεγόμενες διαφορικές χρώσεις επειδή τα κύτταρα δε χρωματίζονται κατά τον ίδιο τρόπο. Έτσι ανάλογα με την αντίδραση που παρουσιάζουν τα βακτήρια στη χρώση Gram διακρίνονται σε δυο μεγάλες ομάδες α) τα Gram-θετικά και β) Gram-αρνητικά βακτήρια. Αυτή η διαφοροποίηση οφείλεται στην διαφορετική δομή του κυτταρικού τοιχώματος στις δύο ομάδες βακτηρίων. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι:

- Μια σταγόνα απιονισμένου νερού τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα και κύτταρα βακτηρίων από το επωασμένο τρυβλίο μεταφέρονται ασηπτικά με βακτηριολογικό κρίκο και δημιουργείται κατά το δυνατόν ομοιογενές γαλάκτωμα.
- Το παρασκεύασμα προσηλώνεται στην αντικειμενοφόρο πλάκα, περνώντας την πάνω από τη φλόγα λύχνου, χωρίς όμως να υπερθερμανθεί. Η προσήλωση ολοκληρώνεται όταν το παρασκεύασμα στεγνώσει.
- Επί του παρασκευάσματος προστίθενται μερικές σταγόνες κρυσταλλικού ιώδους και η χρωστική επαφίεται να δράσει για 1 min.
- Στη συνέχεια απομακρύνεται η περίσσεια της χρωστικής με νερό και το

- παρασκεύασμα επεξεργάζεται για 3 min με διάλυμα I2/KI. Το παρασκεύασμα ξεπλένεται με αλκοόλη 95% (σταγόνα-σταγόνα για 1) και στη συνέχεια με άφθονο νερό (επίσης σταγόνα-σταγόνα).
- Το παρασκεύασμα καλύπτεται με σαφρανίνη (για 1-2 min) και στη συνέχεια ξεπλένεται η περίσσεια της χρωστικής με νερό. Η περίσσεια του νερού απομακρύνεται με απορροφητικό χαρτί, χωρίς αυτό να σύρεται στην επιφάνεια της πλάκας. Ακολουθεί μικροσκοπική παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο με ελαιοκαταδυτικό φακό (μεγέθυνση x100).

2.7 Επίδραση της μικροδομής του τροφίμου και του βάθους ανάπτυξης στη φυσιολογία της *Listeria monocytogenes*.

Στο πείραμα μελετήθηκε η ανάπτυξη των δύο στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού σε υγρά και στερεά υποστρώματα σε δύο διαφορετικά βάθη, επιφάνεια και πυθμένα. Σκοπός αυτού του πειράματος ήταν να μελετηθεί πώς επηρεάζει η μικροδομή του υποστρώματος (στερεό, υγρό) και το βάθος ανάπτυξης, ως περιοριστικός παράγοντας για την διάχυση προϊόντων, την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes*, αλλά και τη συμπεριφορά της έναντι όξινων συνθηκών καταπόνησης. Χρησιμοποιήθηκαν δύο θερμοκρασίες συντήρησης, 4° C, 10° C ως ενδεδειγμένη θερμοκρασία συντήρησης – ψύξης τροφίμων και μία μέση θερμοκρασία οικιακού ψυγείου αντίστοιχα ως η χαμηλότερη θερμοκρασία ενός ψυγείου. Τα υποστρώματα που αναπτύχθηκαν ήταν μύξη ζελατίνης και TSBYE. Στη συνέχεια ενοφθαλμίζονταν σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (TSBYE pH 2.0) .

2.7.1 Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης

Ως υγρό θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε Tryptone Soy Broth με Yeast Extract (0,6% w/V). Ως στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε Tryptone Soy Broth με Yeast Extract (0,6% w/V) με 10% w/V ζελατίνη (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Η ζελατίνη προστέθηκε ως στερεοποιητικός παράγοντας για να ληφθεί ένα δομημένο πρότυπο σύστημα που μιμείται τις ιδιότητες μικροδομής των προϊόντων διατροφής (Mertens et al, 2009).

Για την προετοιμασία του στερεού θρεπτικού μέσου με ζελατίνη, παρασκευάστηκαν ξεχωριστά TSBYE υδατικό διάλυμα ζελατίνης διπλής ισχύος. Ο όρος διπλή ισχύς αναφέρεται στην προσθήκη διπλάσιου βάρους στερεής ουσίας (θρεπτικό ή ζελατίνη) σε συγκεκριμένο όγκο νερού, ώστε να προκύψει διάλυμα διπλάσιας συγκέντρωσης από την επιθυμητή. Το pH του TSBYE ρυθμίστηκε στο 6,2 pH με τη χρήση HCl. Η παρασκευή του διαλύματος ζελατίνης πραγματοποιήθηκε σε σωλήνες Falcon χωρητικότητας 50ml. Η ζελατίνη προστίθεντο σε μικρές δόσεις σε προθερμασμένο στους 60°C νερό (σε υδατόλουτρο). Ακολουθούσε καλή ανάδευση και τοποθέτηση των falcons σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 60°C ώστε να διευκολυνθεί η πλήρης διαλυτοποίησή της ζελατίνης. Στη συνέχεια μεταφέρθηκε ο όγκος της ζελατίνης σε φιάλες Duran. Κατόπιν τόσο το διάλυμα ζελατίνης, όσο και το υγρό TSBYE αποστειρώθηκαν. Μετά την αποστείρωση αναμείχθηκαν (1:1) τα ζεστά διαλύματα TSBYE και ζελατίνης, ώστε τελικά να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση, TSBYE με 10% w/V ζελατίνη. Τα έτοιμα θρεπτικά υποστρώματα αφέθηκαν σε υδατόλουτρο έως ότου η θερμοκρασία τους να γίνει 37-40°C, ώστε να παραμείνει σε υγρή μορφή το μέσο με ζελατίνη και να δύναται να εμβολιαστεί, χωρίς τα κύτταρα να καταπονηθούν.

2.7.2 Εμβολιασμός του μέσου ανάπτυξης

Χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *Listeria monocytogenes* PL1 και PL2, και το εμβόλιο προετοιμάστηκε όπως περιγράφεται παραπάνω σε αντίστοιχη παράγραφο. Το θρεπτικό μέσο (στερεό ή υγρό) εμβολιάστηκε σε τελική συγκέντρωση 10^3 CFU/ml. Ακολούθησε διαμοιρασμός του εμβολιασμένου θρεπτικού μέσου

ανάπτυξης σε Falcons χωρητικότητας 15ml (10ml ανά σωλήνα Falcon) και συντήρηση σε δύο θερμοκρασίες, 4° C και 10° C.

Όσον αφορά στα στερεά θρεπτικά μέσα ανάπτυξης, χρησιμοποιήθηκε και μία επιπλέον προσέγγιση βάθος ανάπτυξης ανά Falcon. Συγκεκριμένα σε σωλήνες Falcon προστέθηκαν 4ml εμβολιασμένου υποστρώματος και αφού στερεοποιούταν (στη μετέπειτα θερμοκρασία συντήρησης 4°C ή 10°C), προστίθεντο 6ml μη εμβολιασμένου υποστρώματος. Αντίστοιχα, σε άλλη σειρά Falcon προσθέτονταν πρώτα το μη εμβολιασμένο (6ml) και κατόπιν το εμβολιασμένο (4ml) υπόστρωμα. Έτσι είχαν εμβολιαστεί σε δύο διαφορετικά βάθη, στην επιφάνεια (upper) και στον πυθμένα (bottom) όπως παρουσιάζεται στο σχήμα:

2.7.3 Διαδικασία δειγματοληψίας

Δειγματοληψία διενεργούνταν σε τακτά χρονικά διαστήματα με σκοπό την καταμέτρηση του εκάστοτε πληθυσμού πριν και μετά από υποβολή αυτού σε όξινη καταπόνηση. Σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν δύο δείγματα που αντιπροσώπευαν κύτταρα ανεπτυγμένα σε διαφορετικά βάθη, δηλαδή επιφάνεια και πυθμένα.

2.7.4 Υγρά δείγματα

Όσον αφορά στα υγρά υποστρώματα ανάπτυξης (χωρίς ζελατίνη) λαμβανόταν όγκος 1,5ml από την επιφάνεια του δείγματος (επιφάνεια). Κατόπιν, απομακρυνόταν με τη βοήθεια πιπέτας όγκος 4-5ml. Έπειτα, δείγμα όγκου 1,5ml λαμβανόταν και αποτελούσε το δείγμα-πυθμένα.

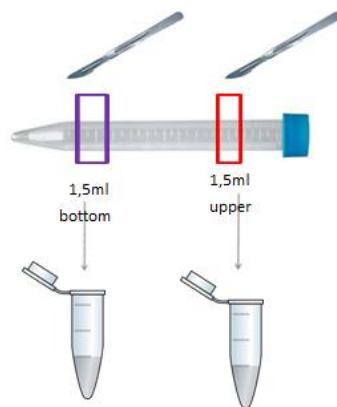
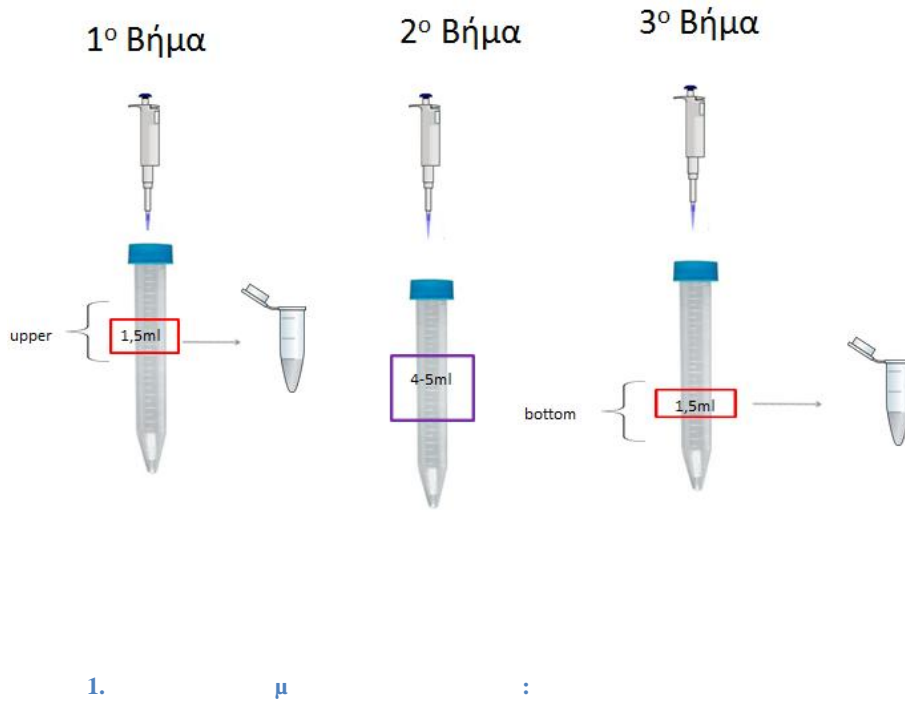
3.7.5 Στερεά δείγματα

Για τα στερεά δείγματα (ζελατίνη 10% w/V), με τη βοήθεια νυστεριού απομακρυνόταν τμήμα του πλαστικού σωλήνα falcon και περίπου 1,2-1,5ml εμβολιασμένου υποστρώματος μεταφερόταν σε σωλήνα erpendorf. Με την παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου η ζελατίνη υγροποιούνταν και οι ακόλουθες διαδικασίες γίνονταν με τη βοήθεια πιπέτας (Εικόνα 2).

Από τα παραπάνω δείγματα α) 100μl αυτού χρησιμοποιούταν άμεσα για καταμέτρηση του πληθυσμού με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης σε μη επιλεκτικό υπόστρωμα TSAYE και ακόλουθη επώαση στους 30°C για 24-48h . β) όγκος 1ml υποβαλλόταν σε συνθήκες όξινης καταπόνησης, δηλαδή σε 9ml TSBYE pH 2,0 (ρυθμισμένο με HCl). Δείγματα λαμβάνονταν ανά 20min-240min και η καταμέτρηση του πληθυσμού γινόταν σε TSAYE τριβλία, όπως αναφέρεται παραπάνω.

Κάθε δειγματοληψία περιελάμβανε δύο βιολογικές επαναλήψεις ανά δείγμα και για τον υπολογισμό του τελικού πληθυσμού των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος αυτών.

Δειγματοληψία Υγρών υποστρωμάτων



2. μ μ

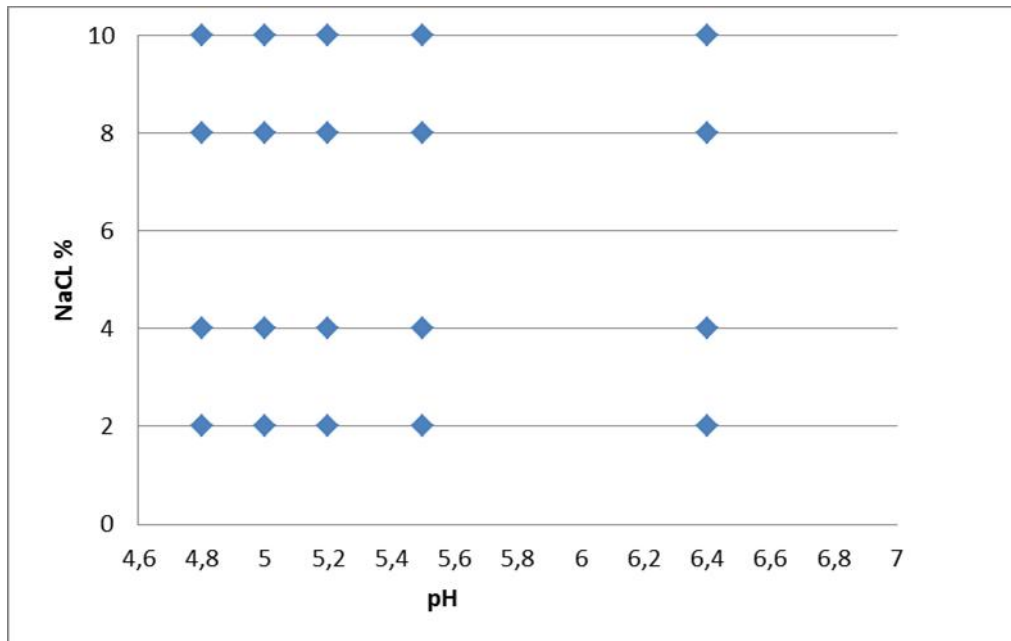
2.8 Εκτίμηση των οριακών συνθηκών ανάπτυξης στην επιβίωση της *Listeria monocytogenes*

2.8.1 Σκοπός

Στόχος του πειράματος αυτού ήταν η μελέτη α) της επίδρασης, μη-βέλτιστων για την ανάπτυξη, συνδυασμών pH- NaCl και της χαμηλής θερμοκρασίας (4°C) συντήρησης στην συμπεριφορά διαφορετικών στελεχών του *Listeria monocytogenes*, υπό συνθήκες όξινης καταπόνησης και β) την επίδραση των παραπάνω συνθηκών συντήρησης στη φυσιολογία της *Listeria monocytogenes*, σε μοριακό επίπεδο.

2.8.2 Στελέχη και συνθήκες ανάπτυξης

Χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη της *Listeria monocytogenes*, 6179 (serotype 1/2a) - PL1 and C₅ (serotype 4b)- PL2, τα οποία προετοιμάστηκαν όπως περιγράφεται σε προηγούμενη παράγραφο. Σε όλη την πειραματική διαδικασία το βασικό θρεπτικό υλικό ανάπτυξης ήταν Tryptone Soy Broth με Yeast Extract 0,6% w/V, το οποίο και διαμοιράστηκε σε 120 Duran των 250 ml (200 ml θρεπτικό υπόστρωμα) . Χρησιμοποιήθηκαν πολλαπλοί συνδυασμοί pH (4.8 έως 6,4) και NaCl (0, 2, 4, 8 και 10% w/V) και κάθε ένας προετοιμάστηκε εις τριπλούν (τρεις βιολογικές επαναλήψεις). Η ρύθμιση του pH γινόταν μετά την αποστείρωση με χρήση διαλύματος HCl συγκέντρωσης 6N. Κάθε πειραματική συνθήκη μελετήθηκε για κάθε στέλεχος χωριστά και το ύψος του εμβολίου που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10⁷ CFU/ml. Κατόπιν ακολούθησε συντήρηση στους 10°C για τουλάχιστον δέκα (10) ημέρες.



3. μ .

2.8.3 Διαδικασία δειγματοληψίας

Γινόταν δειγματοληψία σε τακτά χρονικά διαστήματα (ανά δύο μέρες) με σκοπό την καταμέτρηση του εκάστοτε πληθυσμού σε τριβλία TSAYE και επώση στους 30°C για 48h. (Εικόνα 2.)

2.8.4 Συνθήκες όξινης καταπόνησης

Με σκοπό τον προσδιορισμό της συμπεριφοράς κάθε στελέχους της *Listeria monocytogenes* έναντι όξινης καταπόνησης, 10ml καλλιέργειας λαμβανόταν και μετά από φυγοκέντρηση (3min στις 3600 στροφές ανά λεπτό, rpm), το ίζημα που

προέκυπτε επαναδιαλυόταν σε 20ml προθερμασμένου στους 37°C, TSBYE pH 2,0 (ρυθμισμένο μετά την αποστείρωση, με HCl 6N). Ακολουθούσε επώαση στους 37°C για 5min και καταμέτρηση των επιβιωσάντων μικροοργανισμών σε TSAYE.

2.8.5 Απομόνωση ολικού RNA

Με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης των συνδυασμών pH-NaCl στη φυσιολογία της *Listeria monocytogenes*, κατά τη συντήρηση και μετά από υποβολή σε όξινη καταπόνηση, 10ml καλλιέργειας πριν και μετά την υποβολή σε όξινη καταπόνηση λαμβάνονταν και κατόπιν η βιομάζα συλλεγόταν με φυγοκέντρηση για 2min στις 3600rpm. Η σταθεροποίηση του RNA επιτυγχανόταν με την προσθήκη RNA protect bacteria (Qiagen) και τα δείγματα φυλάσσονταν στους -20°C.

Η απομόνωση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο hot phenol/ SDS, όπως περιγράφεται από τους Jahn *et al*, 2008, με μικρές τροποποιήσεις. Αρχικά προηγείτο λύση των κυττάρων με προσθήκη 500μl διαλύματος λύσης (Tris 10mM, 1mM EDTA, pH 8,0 και 10mg/ml λυσοζύμη) και επώαση στους 30°C για 20min. Στη συνέχεια, προστίθετο 50μl SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, 10% w/V) και επώαση στο 65°C για 2min. Ακολούθως, προστίθετο 15μl CH₃COONa (3M, pH 4,8) και 600μl προθερμασμένη όξινη φαινόλη και επάζονταν στο 65°C για 6min. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνταν άμεσα στον πάγο, όπου και παρέμεναν για 2-3min. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 5min. Έπειτα το υπερκείμενο μεταφερόταν σε νέο σωλήνα erpendorf και προστίθεντο 1V φαινόλης:χλωροφορμίου:ισοαμυλική αλκοόλης (24:24:1), αναδευόταν και φυγοκεντρούταν στις 13000rpm για 3min. Επαναλαμβάνόταν το προηγούμενο βήμα και ακολούθως το υπερκείμενο μεταφερόταν σε 1V χλωροφορμίου:ισοαμυλική αλκοόλη (24:1 v/V) και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 3min. Η κατακρήμνιση του RNA πραγματοποιούνταν με την προσθήκη 2,5V αιθανόλης (95-100%) και 1/10V CH₃COONa (3M, pH 4,8) και ακόλουθη επώαση στους -80°C O/N. Η παραλαβή των νουκλεϊνικών γινόταν με φυγοκέντρηση στους 4°C, στις 13000rpm για 30min, καθαρισμό με αιθανόλη 70% v/V και φυγοκέντρηση στους 4°C, στις 13000rpm για 5min. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απομακρυνόταν και τα ιζήματα αφήνονταν να στεγνώσουν για

περίπου 20min. Το RNA επαναδιαλυόταν σε 30μl ddH₂O και φυλασσόταν στους -80°C. Η συγκέντρωση του RNA προσδιοριζόταν φωτομετρικά (Implen, NanoPhotometer) με μέτρηση της απορρόφησης στα 260nm. Η καθαρότητα των νουκλεϊνικών οξέων προσδιοριζόταν από το λόγο A_{260nm}/A_{280nm} .

Στη συνέχεια τα δείγματα RNA υποβάλλονταν σε χειρισμό με DNase (Promega), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή, για την απομάκρυνση του DNA από το δείγμα και κατόπιν καθαρίζονταν με φαινόλη – χλωροφόρμιο, όπως περιγράφεται παραπάνω, καθώς και ο ποσοτικός προσδιορισμός αυτών. Ακολούθως, τα δείγματα RNA ελέγχονταν για την παρουσία υπολειμμάτων DNA πραγματοποιώντας Real time PCR και εξειδικευμένους εκκινητές (*16SrRNA*), όπως περιγράφεται σε ακόλουθη παράγραφο.

Η ανάστροφη μεταγραφή πραγματοποιήθηκε σε όγκο 20μl, χρησιμοποιώντας 300ng ολικό RNA, 50ng τυχαία εξαμερή (random hexamers) και το σύστημα SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

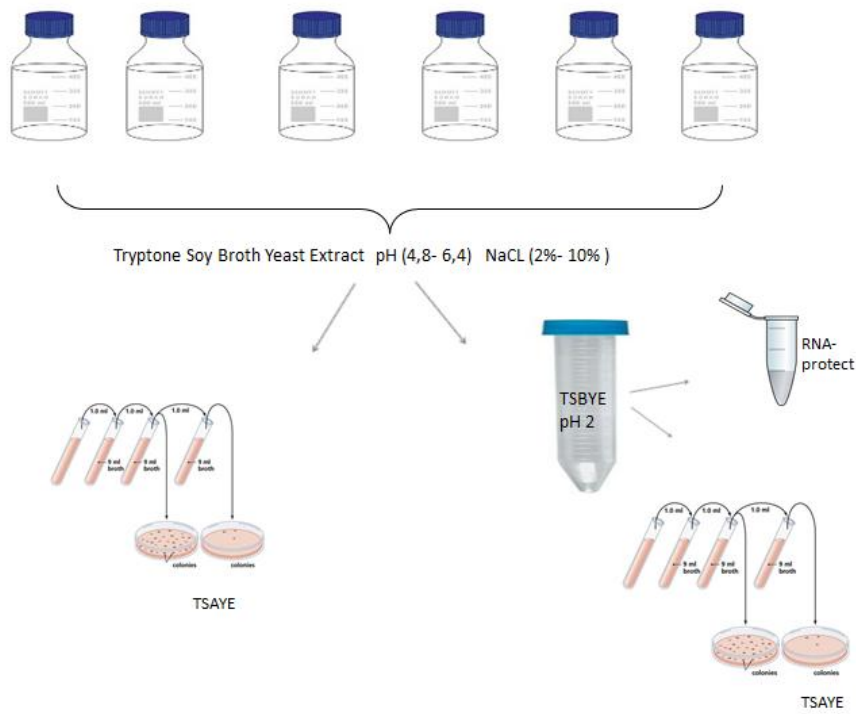
2.8.6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time PCR)

Η Real time PCR πραγματοποιήθηκε στη συσκευή StepOne Plus (Applied Biosystems). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τα υπό μελέτη γονίδια, προέκυψαν μετά από βιβλιογραφική αναζήτηση και φαίνονται στον Πίνακα 1. Η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης PCR (PCR efficiency, E) για κάθε ζεύγος εκκινητών προσδιορίστηκε βάσει της εξίσωσης $E=10^{-1/\text{slope}}$ (Pfaffl 2004), χρησιμοποιώντας διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις cDNA. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνταν σε όγκο 10μl, χρησιμοποιώντας 1μl cDNA ως μήτρα, 2X KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X)ABI Prism™ (Kapa Biosystems) και τους εξειδικευμένους για κάθε γονίδιο εκκινητές σε τελική συγκέντρωση 0,2μmol. Για όλα τα γονίδια ακολουθήθηκε τα παρακάτω θερμοκρασιακό πρόγραμμα: 95°C για 1min, 40 κύκλοι 95°C για 3sec, 59°C για 30sec, 72°C για 30sec, ενώ ακολουθούσε ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης (Melting Curve Analysis) ως εξής: 95°C για

15sec, 50°C για 1min και 0,3°C sec⁻¹ έως 95°C για 15sec. Για κάθε γονίδιο, περιλαμβάνονταν θετικός και αρνητικός μάρτυρας.

Τα επίπεδα έκφρασης των διαφορετικών γονιδίων κανονικοποιήθηκαν ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς *16SrRNA*, ως καθολικά εκφραζόμενο γονίδιο σε συνθήκες όξινης και ωσμωτικής καταπόνησης (refere). Ο προσδιορισμός των επιπέδων σχετικής έκφρασης υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο του Pfaffl 2001, η οποία λαμβάνει υπ' όψη τις διαφορετικές PCR Efficiencies των υπό μελέτη γονιδίων. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν για κάθε περίπτωση είναι ο μέσος όρος δύο βιολογικών επαναλήψεων, ενώ διενεργηθήκαν και τεχνικές επαναλήψεις (technical replicates), επιλεκτικά, για κάποια δείγματα.

120 x



4.

μ

3.Αποτελέσματα και συζήτηση

3.1 Επίδραση της μικροδομής του τροφίμου και του βάθους ανάπτυξης στη φυσιολογία της *Listeria monocytogenes* .

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση του βάθους ανάπτυξης και της μικροδομής του υποστρώματος - τροφίμου (υγρό ή στερεό), δύο στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, τόσο στην α) ανάπτυξη του μικροοργανισμού, όσο και στη β) συμπεριφορά του μικροοργανισμού έναντι συνθηκών όξινης καταπόνησης. Επιπλέον, τα παραπάνω μελετήθηκαν σε δύο θερμοκρασίες, 4°C και 10°C, ως ενδεδειγμένη θερμοκρασία συντήρησης – ψύξης τροφίμων και μία μέση θερμοκρασία οικιακού ψυγείου αντίστοιχα. Το θρεπτικό υπόστρωμα που επιλέχθηκε για την προσομοίωση των υγρών και στερεών τροφίμων ήταν το TSBYE και το TSBYE με 10% w/V ζελατίνη ως στερεοποιητικό παράγοντα αντίστοιχα. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα διενεργούνταν δειγματοληψίες, τόσο από τα στερεά, όσο και από τα υγρά υποστρώματα και λαμβάνονταν δείγματα από δύο διαφορετικά βάθη ανάπτυξης των μικροοργανισμών επιφάνεια και πυθμένα, ακολουθώντας τη διαδικασία που αναλυτικά περιγράφεται σε αντίστοιχη παράγραφο στα «Υλικά και Μέθοδοι». Με στόχο τη μελέτη της επίδρασης των συνθηκών ανάπτυξης και στην οξεοανθεκτικότητα των υπό μελέτη στελεχών, τμήμα των λαμβανομένων δειγμάτων υποβαλλόταν σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (TSBYE pH 2, HCl) για 20min-240min στους 37°C, διάστημα στο οποίο, γινόταν εκτίμηση του εκάστοτε μικροβιακού πληθυσμού (προσδιορισμός επιζώντων μικροοργανισμών).

3.1.1 Επίδραση της μικροδομής υποστρώματος και του βάθους δειγματοληψίας στην ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes*

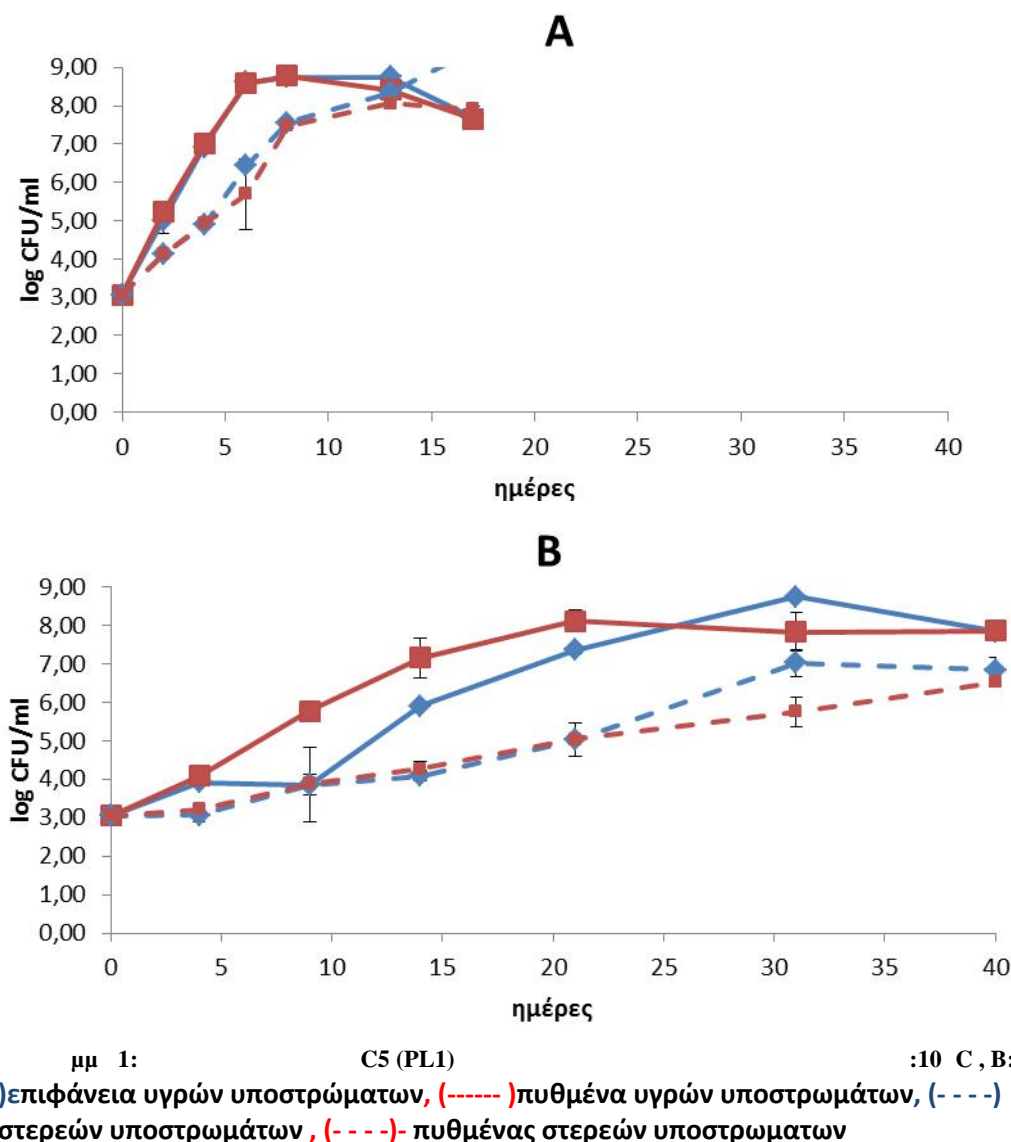
Η ζελατίνη γενικά αναγνωρίζεται ως ασφαλές (GRAS) συστατικό τροφίμων και χρησιμοποιείται ευρέως σε πολλές εφαρμογές σε τρόφιμα όπως αναφερθήκαμε παραπάνω . Τα κανονικά επίπεδα χρήσης κυμαίνονται από 1% έως 5% ανάλογα με τον τύπο του κρέατος, ποσότητα ζωμού και την υφή που θα είναι επιθυμητό στο τελικό προϊόν. Σε γλυκίσματα όπως κολλώδης αρκούδες, ένα σχετικά υψηλό ποσοστό (δηλαδή, 7-9%) της ζελατίνης προστίθεται στο πήκτωμα και στερεοποιηθεί αυτές τις καραμέλες σε ένα κομμάτι που διαλύεται αργά στο στόμα, ενώ την εξομάλυνση της γεύσης. Σε επιδόρπια ζελατίνης πάρα περίπου 7-9% ζελατίνη χρησιμοποιείται σαν ένας παράγοντας πηκτωματοποίησης (GMIA, 2001) ενώ τα ποσοστά ζελατίνης που χρησιμοποιούνται αγγίζουν το 35%. Στην παρούσα μελέτη, η χρήση της ζελατίνης σε συγκεντρώση 10 % w / v επιλέγεται ως μία μέση συγκέντρωση που χρησιμοποιείται για τα τυποποιημένα προϊόντα .

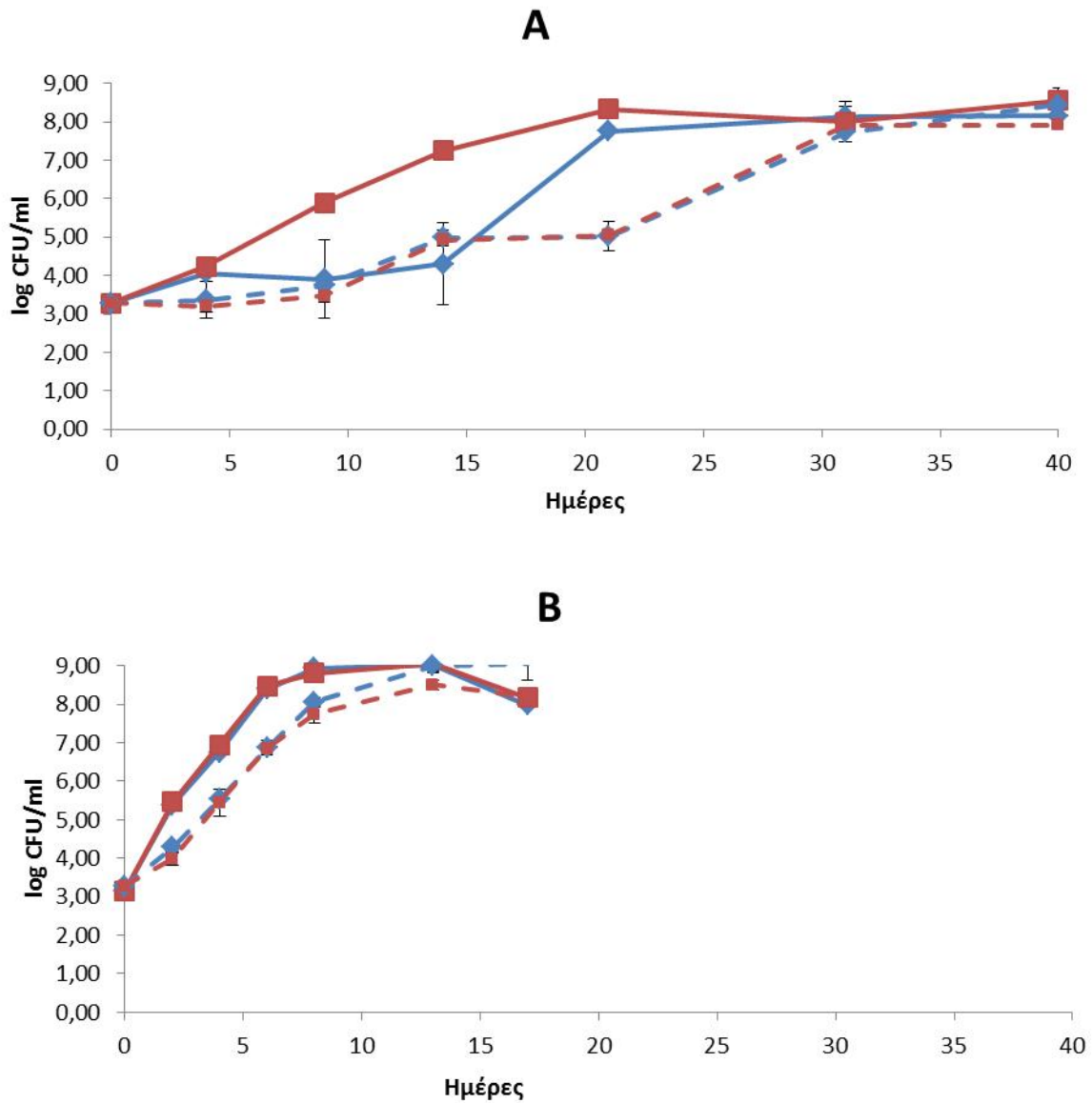
Η ανάπτυξη των δύο στελεχών *Listeria monocytogenes* PL1, PL2 στα υγρά και στερεά υποστρώματα και στα δύο βάθη ανάπτυξης, κατά την διάρκεια συντήρησης τους 4°C και στους 10°C δεν παρουσίασε διαφορές (Διάγραμμα 1). Τα υποστρώματα για κάθε στέλεχος εμβολιάστηκαν με 10³ log CFU/ml και η συντήρηση διήρκεσε 40 μέρες και 17 μέρες για θερμοκρασίες 4°C και 10°C ενώ οι μέγιστοι πληθυσμοί *Listeria monocytogenes* που παρατηρήθηκαν ήταν 10⁸ και 10⁹ log CFU/ml αντίστοιχα για κάθε θερμοκρασία συντήρησης. Επιπλέον, ο ρυθμός ανάπτυξης του παθογόνου στους 10°C ήταν, όπως αναμενόταν, μεγαλύτερος από αυτόν στους 4°C (Διάγραμμα 1).

Όσον αφορά στη μικροδομή των υποστρωμάτων (υγρά και στερεά) παρατηρήθηκε ότι οι μικροοργανισμοί που αναπτύχθηκαν στα στερεά υποστρώματα, ανεξαρτήτως στελέχους και θερμοκρασίας, είχαν μία υστέρηση στην ανάπτυξη σε σχέση με τα υγρά. Πιο συγκεκριμένα όταν οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονταν στα υγρά υποστρώματα εισέρχονταν στην στατική φάση ανάπτυξης, στα στερεά υποστρώματα οι μικροοργανισμοί ήταν ακόμη στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Ο πληθυσμός στο τέλος της εκθετικής φάσης στα υγρά

υποστρώματα στην επιφάνεια ήταν 10^8 log CFU/ml , στον πυθμένα 10^7 log CFU/ml ενώ στους 10° C στο τέλος της εκθετικής φάσης ήταν 10^8 log CFU/ml. Μεταξύ των δύο στελεχών δεν παρουσιάστηκε διαφορά ως προς την ανάπτυξή τους. Η μόνη διαφορά που υπήρξε ήταν μεταξύ των υγρών και των στερεών υποστρωμάτων όπου καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης ήταν περίπου 1 log CFU/ml, μια διαφορά που φαίνεται να εξισώνεται στο τέλος της συντήρησης. Η ζελατίνη στο στερεό υπόστρωμα καθυστερεί την ανάπτυξη των δύο στελεχών όμως και τα δύο στελέχη ήταν σε θέση να αντιμετωπίζουν το στρες της μικροδομής και να έχουν τελικό πληθυσμό ίδιο με τα υγρά υποστρώματα.

Το βάθος δειγματοληψίας, τέλος, δε φαίνεται να επηρεάζει την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes*, ανεξαρτήτως στελέχους (PL1, PL2), θερμοκρασίας συντήρησης και μικροδομής υποστρώματος (στερεό ή υγρό).





Διάγραμμα 2: Ανάπτυξη στελέχους 6179(PL2) κατά την διάρκεια συντήρησης του στους A:10° C , B: 4° C, (----)επιφάνεια υγρών υποστρωμάτων, (-----) πυθμένα υγρών υποστρωμάτων, (---) επιφάνεια στερεών υποστρωμάτων, (- - - -) πυθμένας στερεών υποστρωμάτων

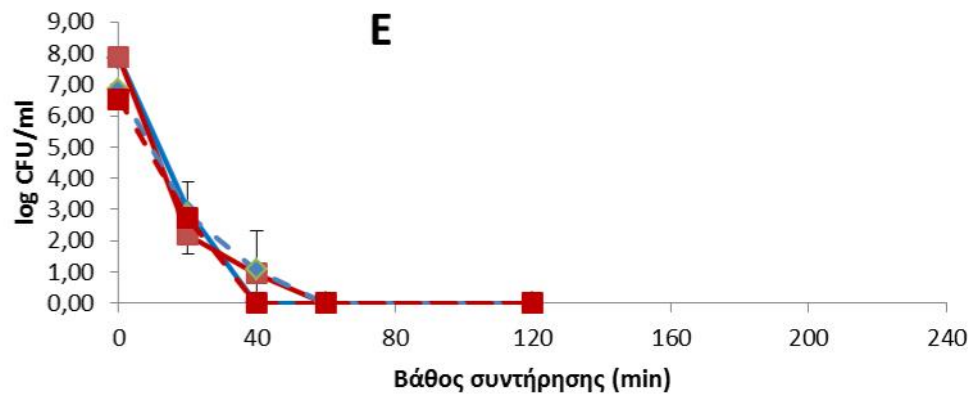
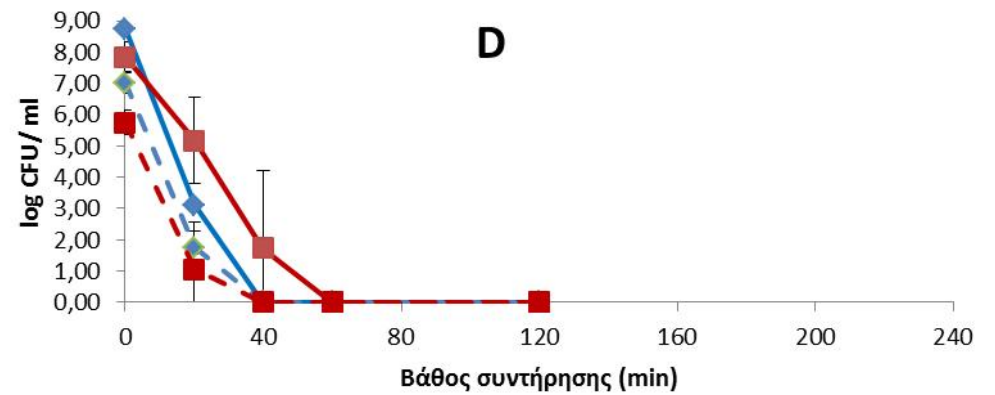
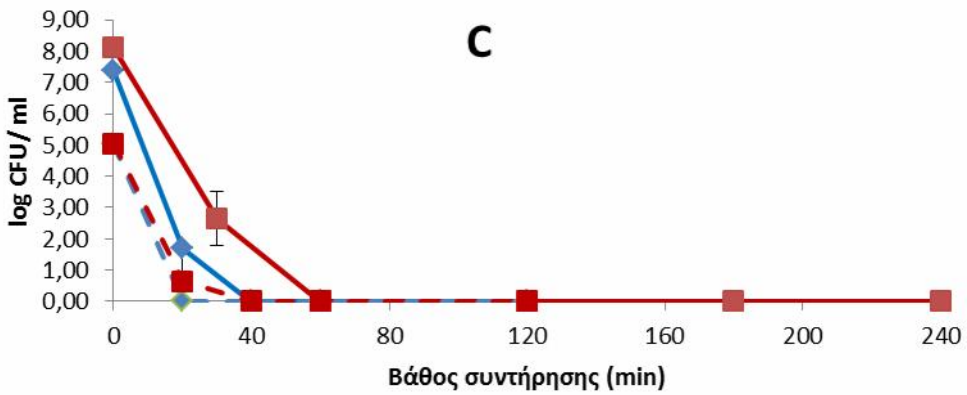
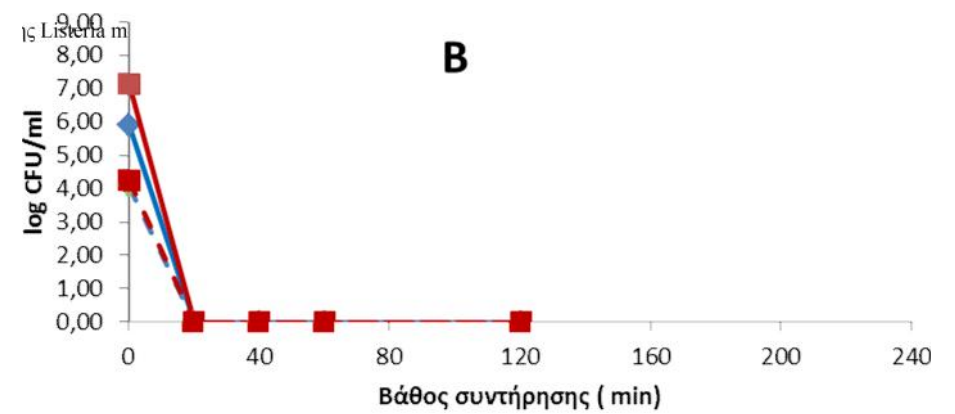
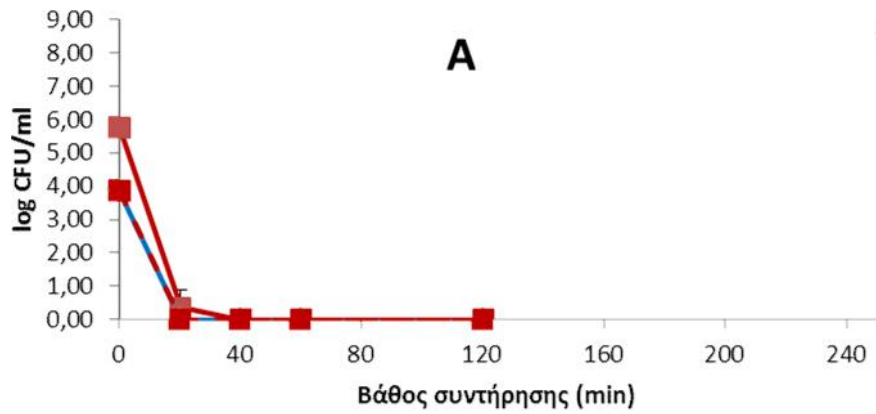
3.1.2 Επίδραση της μικροδομής του υποστρώματος και του βάθους δειγματοληψίας στην επιβίωση της *Listeria monocytogenes* σε συνθήκες όξινης καταπόνησης

Για τη μελέτη της επίδρασης των συνθηκών ανάπτυξης (μικροδομή υποστρώματος, θερμοκρασία συντήρησης και βάθος ανάπτυξης) στην επιβίωση των στελεχών *Listeria monocytogenes* PL1, PL2, έναντι συνθηκών όξινης καταπόνησης, οι βακτηριακοί πληθυσμοί, για κάθε ημέρα δειγματοληψίας, υποβάλλονταν σε όξινη καταπόνηση (37°C, TSBYE pH 2.0, HCl).

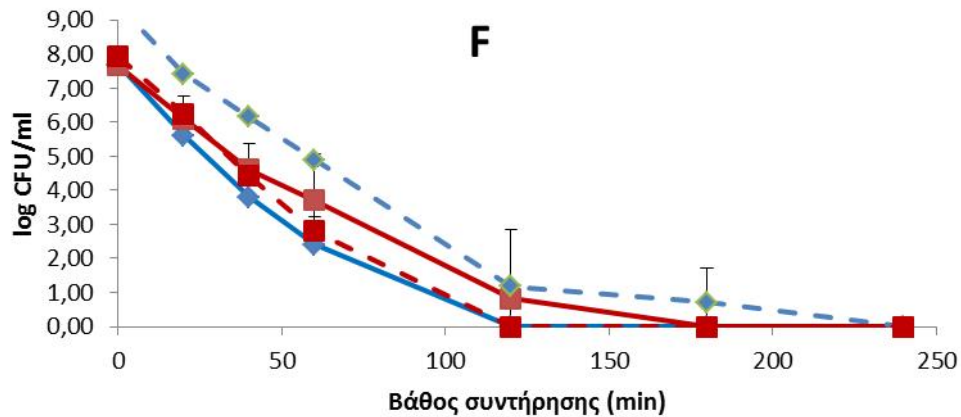
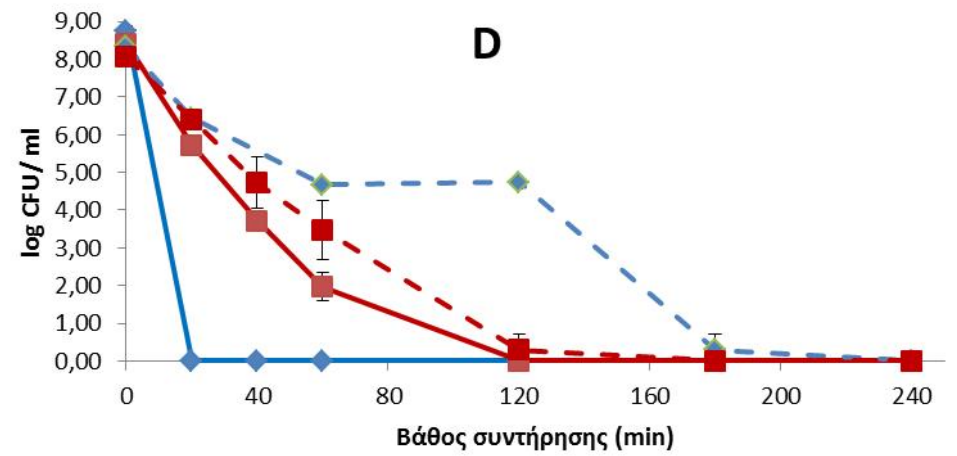
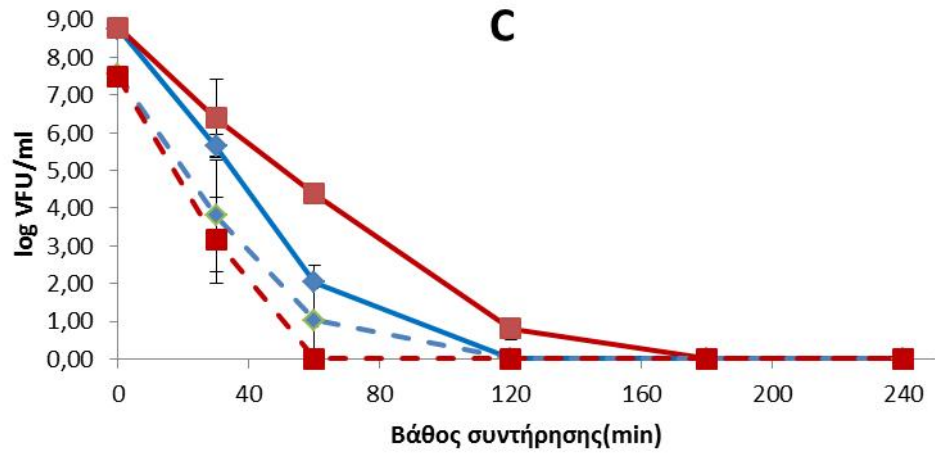
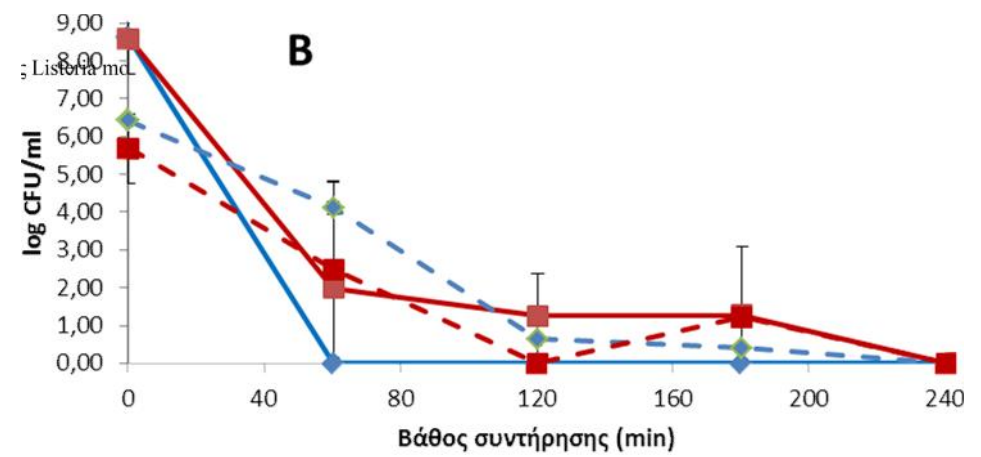
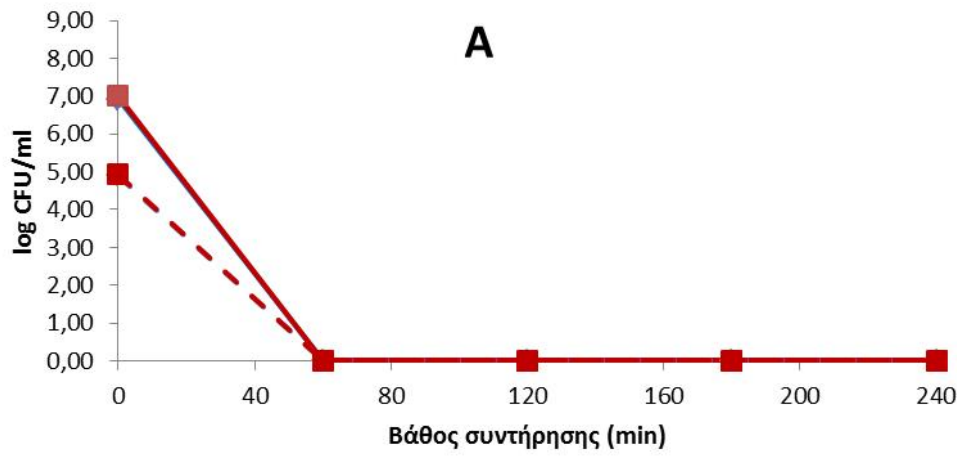
Για τα διαφορετικά στελέχη της *Listeria monocytogenes* PL1 και PL2, δεν παρατηρήθηκε διαφορά ως προς την συμπεριφορά τους σε συνθήκες όξινης καταπόνησης, ανεξαρτήτως θερμοκρασίας συντήρησης και μικροδομής υποστρώματος. Πιο συγκεκριμένα, οι μικροοργανισμοί που αναπτύχθηκαν στους 4°C (Διάγραμμα 3 & 5), καθ' όλη την διάρκεια συντήρησης, δεν παρουσίασαν επιβίωση, μετά από 60min όξινης καταπόνησης, σημειώνοντας μείωση τουλάχιστον 7 log CFU/ml. Αντίθετα, στους 10°C για την ίδια φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού και τον ίδιο χρόνο όξινης καταπόνησης η μείωση αυτή περιορίστηκε στους 4 log CFU/ml. Επιπλέον, στην τελευταία περίπτωση (10°C) (Διάγραμμα 4 & 6), παρατηρήθηκε επιβίωση της *Listeria monocytogenes*, ακόμη και μετά από 120min παραμονής σε συνθήκες όξινης καταπόνησης. Και για τις δύο θερμοκρασίες συντήρησης, ο μέγιστος χρόνος επιβίωσης, σημειώθηκε στο τέλος περίπου του χρόνου συντήρησης, όταν δηλαδή τα κύτταρα βρίσκονταν στη στατική φάση ανάπτυξης. Τα παραπάνω αποτελέσματα συγκλίνουν με προηγούμενες μελέτες (Ivy et al, 2012), στις οποίες φάνηκε ότι συντήρηση σε ευνοϊκότερες θερμοκρασίες για την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* (37°C) προάγουν μηχανισμούς οξεοανθεκτικότητας, με συνέπεια τη μεγαλύτερη επιβίωσή της έναντι ακόλουθης όξινης καταπόνησης, συγκριτικά με χαμηλότερες θερμοκρασίες ανάπτυξης (10°C). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι το φαινόμενο αυτό παρατηρείται και μεταξύ χαμηλότερων θερμοκρασιών συντήρησης

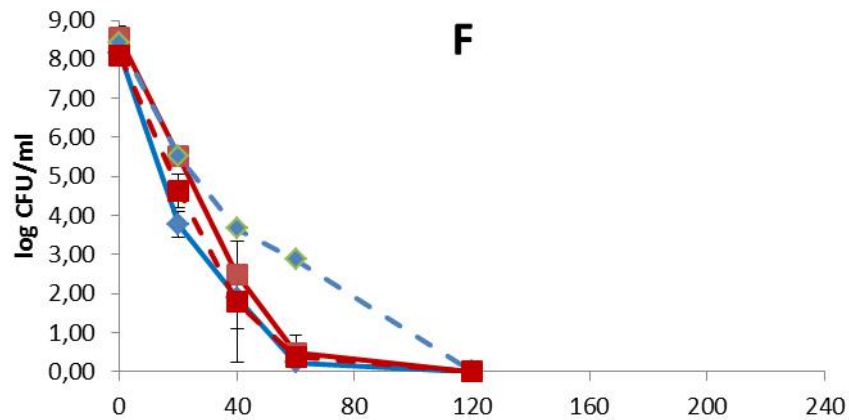
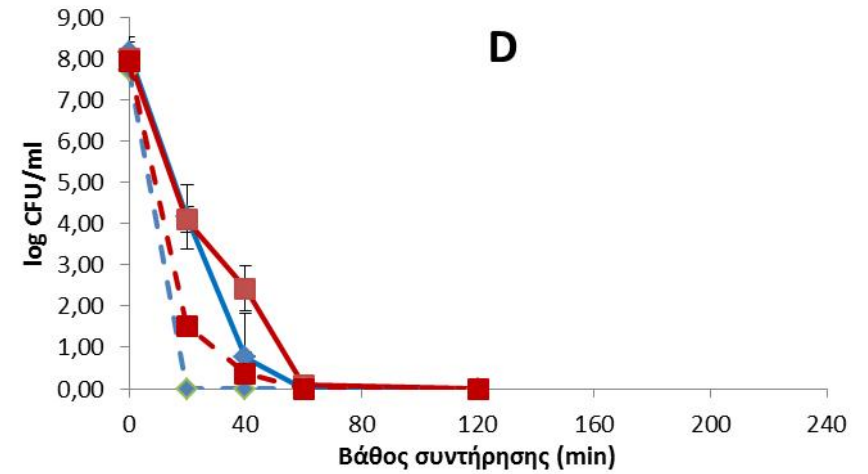
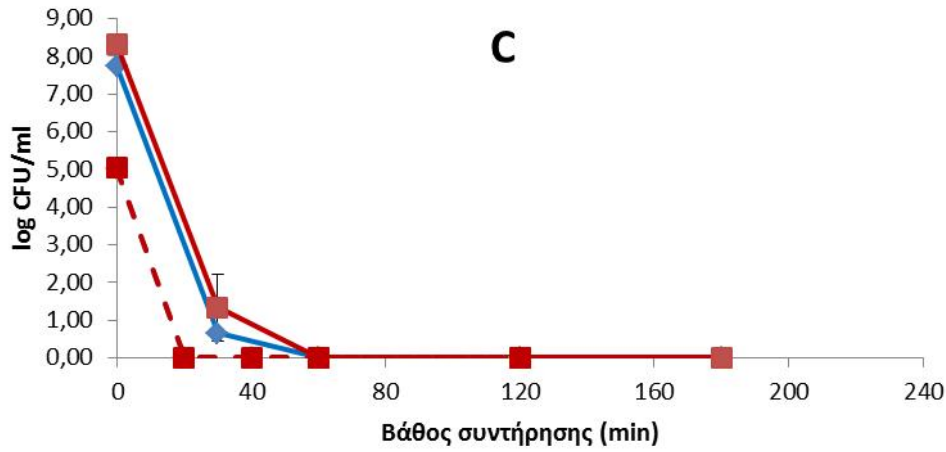
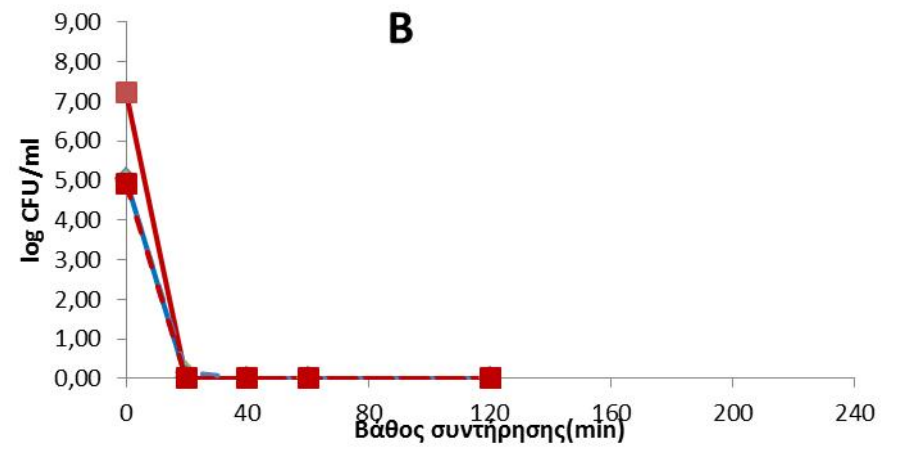
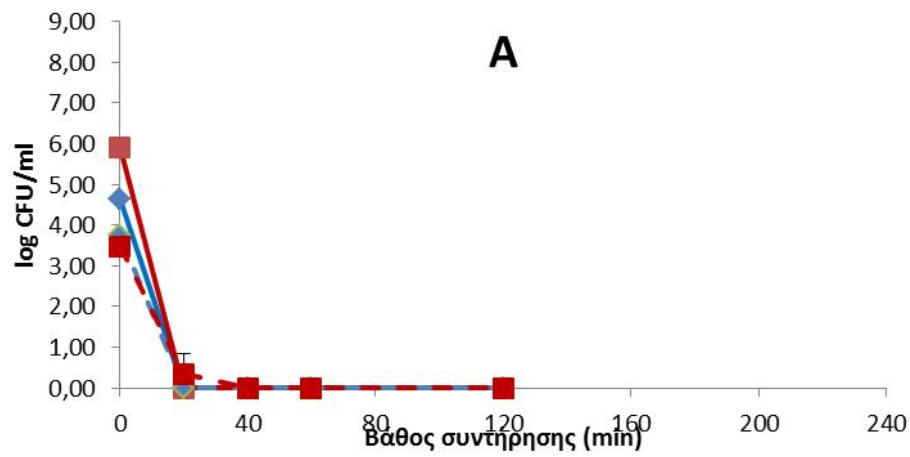
(10°C έναντι 4°C), ενώ η επιβίωση του παθογόνου σε συνθήκες όξινης καταπόνησης ακόμη και μετά από 2h, όταν προηγουμένως συντηρούταν στους 10°C, επιδεικνύει τον κίνδυνο που εγκυμονεί οι υψηλές θερμοκρασίες συντήρησης-ψύξης ενός τροφίμου στα οικιακά ψυγεία.

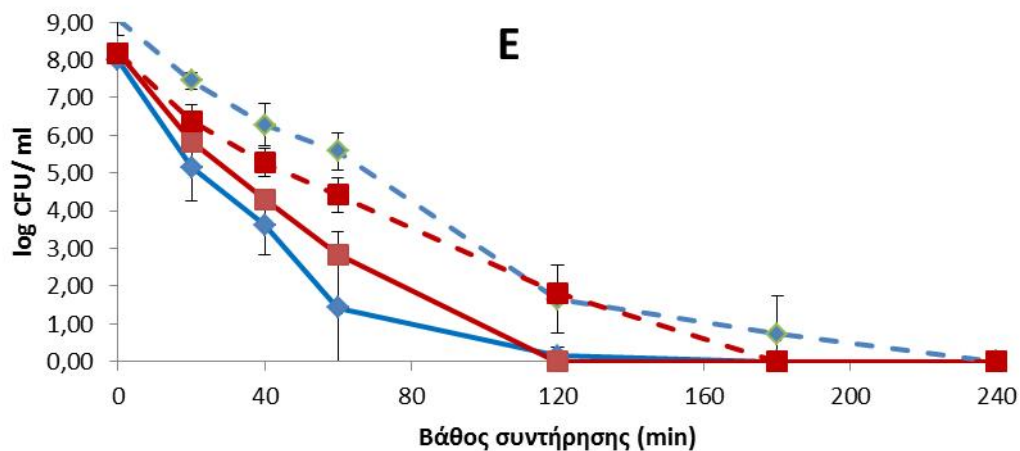
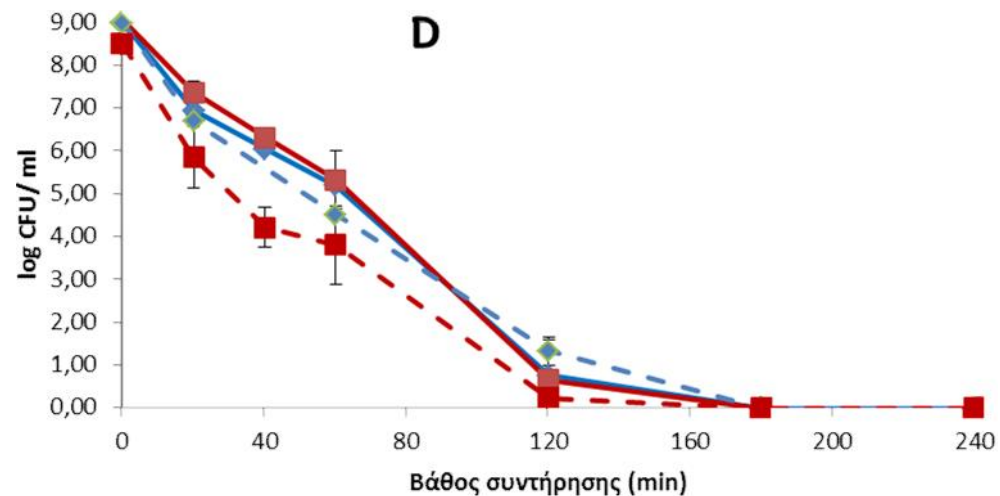
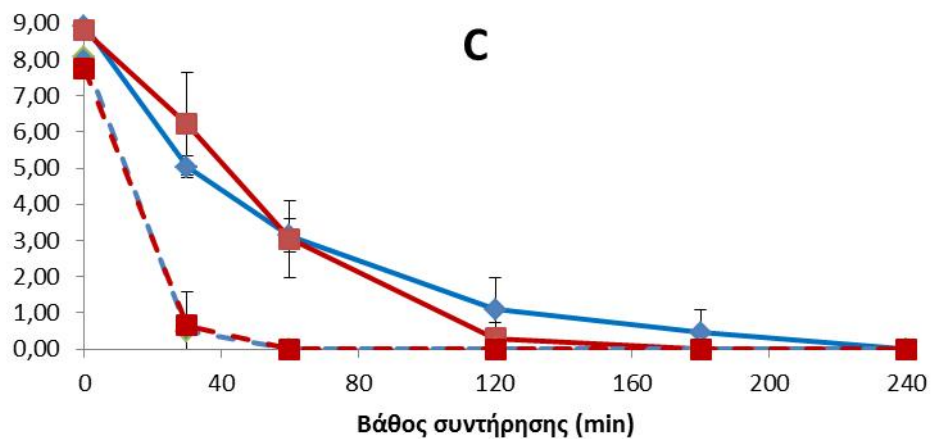
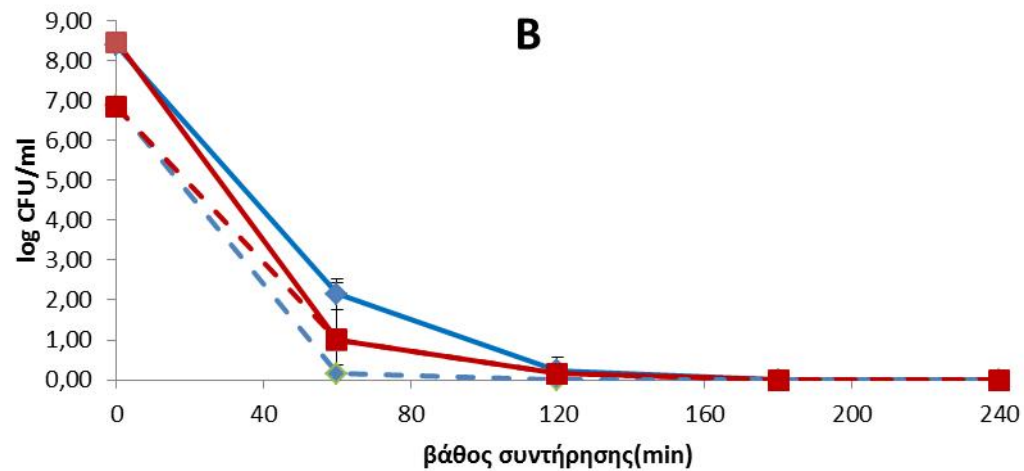
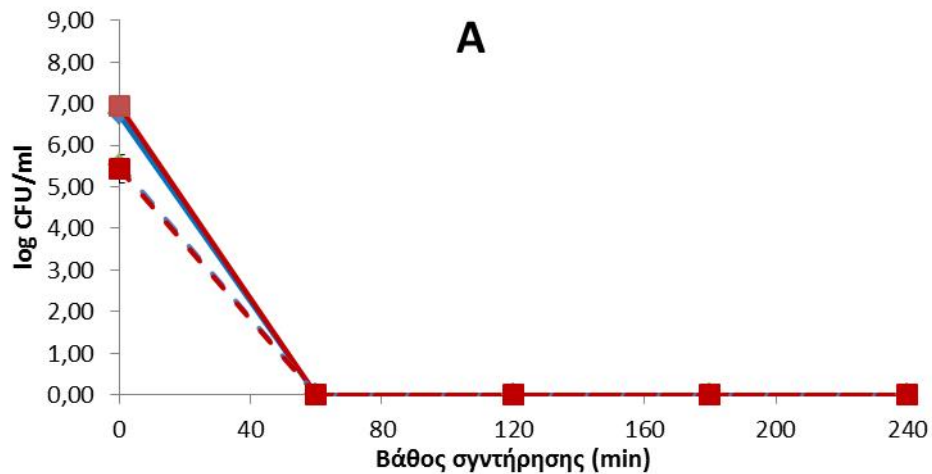
Από την άλλη, τόσο το βάθος δειγματοληψίας, όσο και η μικροδομή του υποστρώματος, δε φαίνεται να διαφοροποιούν τη συμπεριφορά (επιβίωση) των μικροοργανισμών έναντι όξινης καταπόνησης. Εντούτοις, βακτηριακά κύτταρα ανεπτυγμένα σε υγρό υπόστρωμα φαίνεται να παρουσιάζουν μεγαλύτερη επιβίωση έναντι όξινης καταπόνησης σε σχέση με κύτταρα ανεπτυγμένα σε στερεό υπόστρωμα, φαινόμενο που αντιστρέφεται κατά τις τελευταίες ημέρες συντήρησης. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο ότι τα κύτταρα στα υγρά υποστρώματα βρίσκονταν στη στατική φάση ανάπτυξης σε αντίθεση με τα κύτταρα των στερεών υποστρωμάτων που βρίσκονταν στην εκθετική φάση.



μμ 3. , pH 2- HCL 6N ,TSBYE, C5 (PL1) 4 C. μ : 9, :14, C: 21, D: 31, E: 40,
 ,(---) επιφάνεια υγρών υποστρώματων, (----) πυθμένα υγρών υποστρωμάτων, (- - -) επιφάνεια στερεών υποστρωμάτων, (---) πυθμένας στερεών υποστρωμάτων







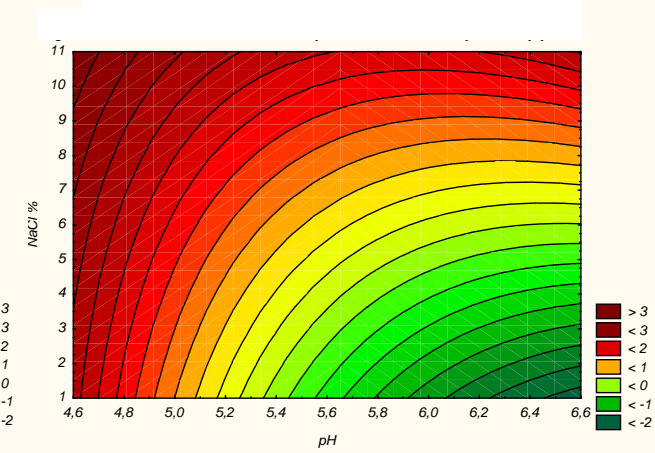
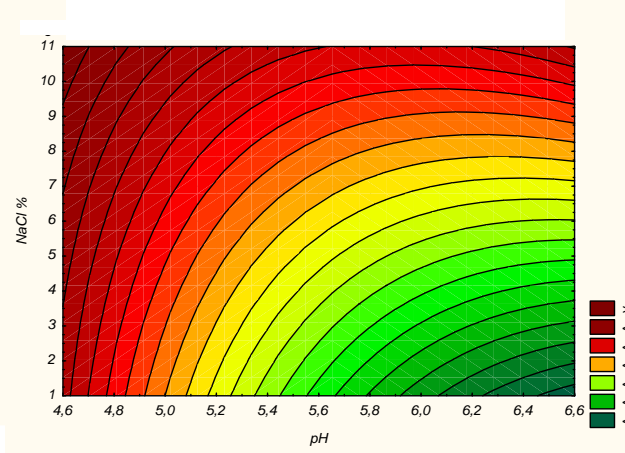
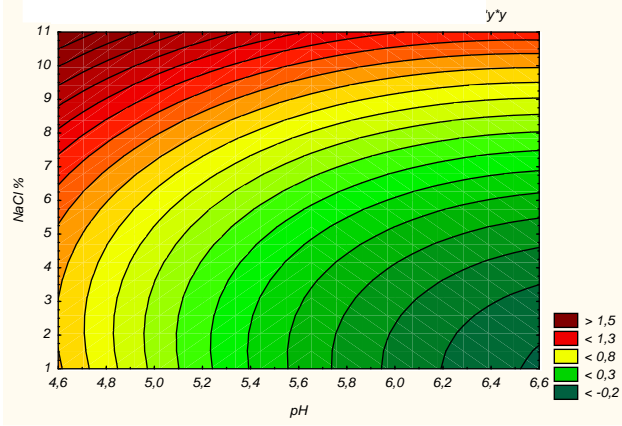
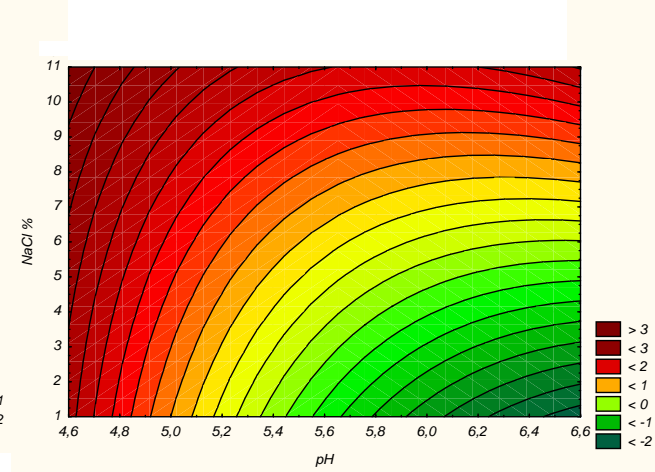
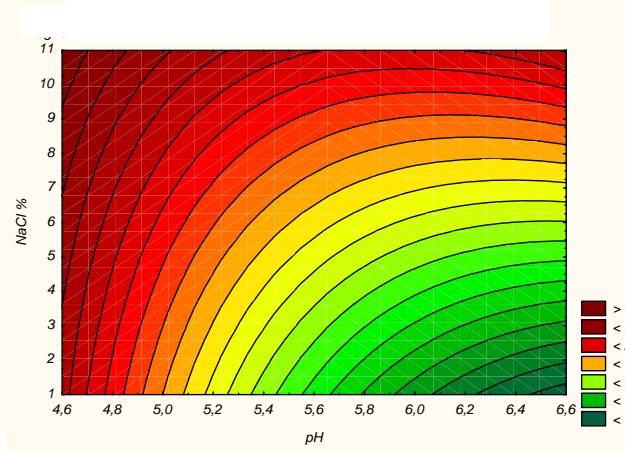
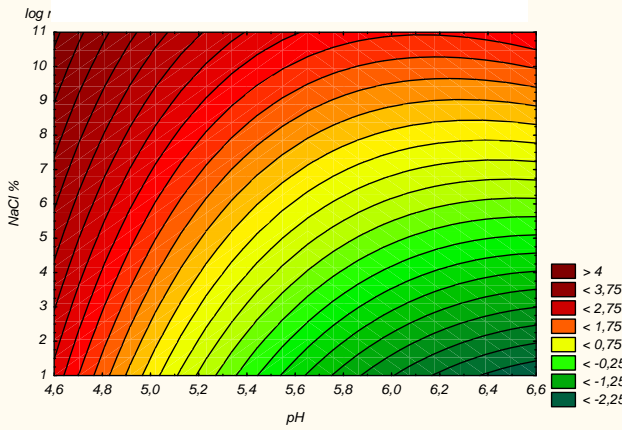
3.2 Εκτίμηση των οριακών συνθηκών ανάπτυξης στην επιβίωση της *Listeria monocytogenes*

Έχει παρατηρηθεί ότι έκθεση του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε υποθανάτια επίπεδα μιας καταπόνησης, μπορεί να οδηγήσει στην επαγωγή της ανθεκτικότητας στην ίδια ή διαφορετικού είδους δριμύτερες καταπονήσεις (Lou & Yousef, 1997). Η απόκτηση αυξημένης όξινης ανθεκτικότητας περιλαμβάνει την έκθεση σε ήπια όξινες συνθήκες ανάπτυξης (Koutsoumanis *et al.*, 2003). Έχει βρεθεί ότι, πολλοί στρεσογόνοι παράγοντες οι οποίοι τις περισσότερες φορές χρησιμοποιούνται και ως μέθοδοι συντήρησης, όπως είναι η θέρμανση, το αλάτι και οι χαμηλές τιμές pH, παράλληλα επάγουν την προστασία έναντι άλλων παραγόντων που προκαλούν καταπόνηση και οι οποίοι βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα, καθιστώντας έτσι τα βακτήρια ικανά να επιβιώσουν υπό αντίξοες συνθήκες (Casey & Condon, 2002, Flahaut *et al.*, 1996). Οι προσαρμοσμένες σε συνθήκες όξινης καταπόνησης καλλιέργειες έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν ανθεκτικότητα έναντι στη θέρμανση και την ακτινοβολήση (Samelis *et al.*, 2003). Το φαινόμενο αυτό που ονομάζεται και «σκληραγώγηση υπό συνθήκες καταπόνησης» (stress hardening) παρατηρείται και στο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes* (Faleiro *et al.*, 2003, O'Driscoll *et al.*, 1996, Lou και Yousef, 1997, Skandamis *et al.*, 2008).

Με σκοπό τη μελέτη της συνδυαστικής επίδρασης pH-NaCl στην απόκριση δύο διαφορετικών στελεχών *Listeria monocytogenes* έναντι συνθηκών όξινης καταπόνησης, υγρά υποστρώματα με συνδυασμούς pH (4,8 έως 6,4) και NaCl (2%-10% w/v.) εμβολιάστηκαν με τον παθογόνο σε τελικό πληθυσμό 10^7 CFU/ml. Κατά τις δειγματοληψίες, οι οποίες διενεργούνταν ανά δύο ημέρες, προσδιοριζόταν ο εκάστοτε πληθυσμός του μικροοργανισμού ενώ στη συνέχεια προσδιοριζόταν η δυνατότητα επιβίωσης έναντι συνθηκών όξινης καταπόνησης (TSBYE pH 2, HCl) στους 37°C για 5 min. Επιπλέον, βιομάζα φυλασσόταν για μετέπειτα απομόνωση RNA και μελέτη της σχετικής έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση σε καταπονήσεις.

3.2.1 Επίδραση pH-NaCl στην ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes*

Όσον αφορά στην ανάπτυξη των δύο στελεχών που μελετήθηκαν τα οποία προσδιορίστηκαν σε διαφορετικές ημέρες κατά την διάρκεια της συντήρησής τους στους 7° C, παρατηρήθηκε αύξηση και για του δύο ορότυπους κοντά στις βέλτιστες τιμές pH και χαμηλές συγκεντρώσεις NaCl, συγκεκριμένα σε pH 6,4 και 2% - 4% NaCl. Τα δύο στελέχη φτάνουν σε μέγιστο πληθυσμό 9 log CFU/ml σε περίπου 10 μέρες. Παρόλα αυτά το στέλεχος C5 (PL1) επηρεάζεται περισσότερο από την παρουσία του χαμηλού pH ($\leq 5,5$) και την υψηλή συγκέντρωση NaCl (8-10%), με αποτέλεσμα να παρατηρείται μείωση 4-6 log CFU/ml την 10^η ημέρα, ενώ στο στέλεχος 6179 (PL2) παρατηρήθηκε μείωση 2-3 log CFU/gr την ίδια χρονική στιγμή. Τέλος τα όρια-περιοχές ανάπτυξης του 6179 (PL2), κατά τη διάρκεια τη συντήρησης, φαίνονται να μετατοπίζονται προς υψηλότερες συγκεντρώσεις άλατος και χαμηλότερες τιμές pH, σε σχέση με την αντίστοιχη του C5 (PL1).

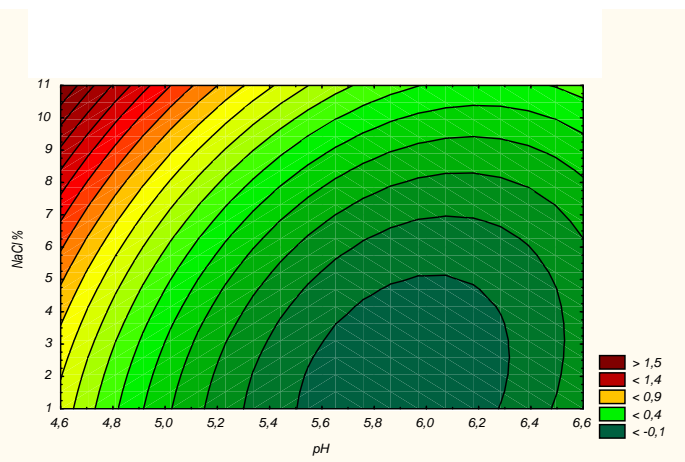
A**B****C***Listeria monocytogenes***D****E****F** $\mu\mu$ 7: μ μ

C5 (PL1)

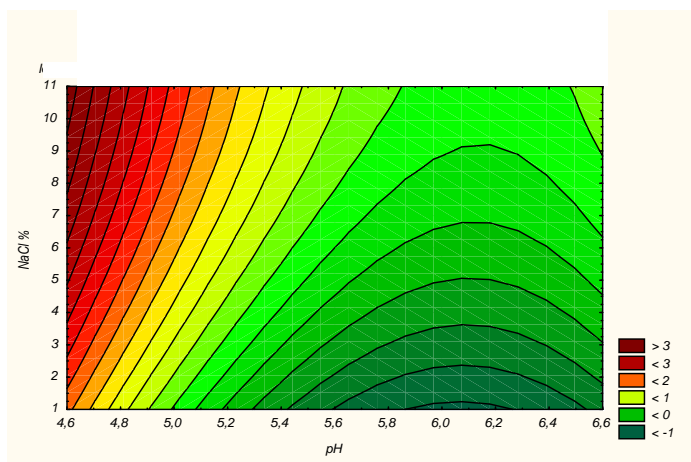
7 C, μ μ

A:2, B:4, C:6, D:8, E:10 F: 15

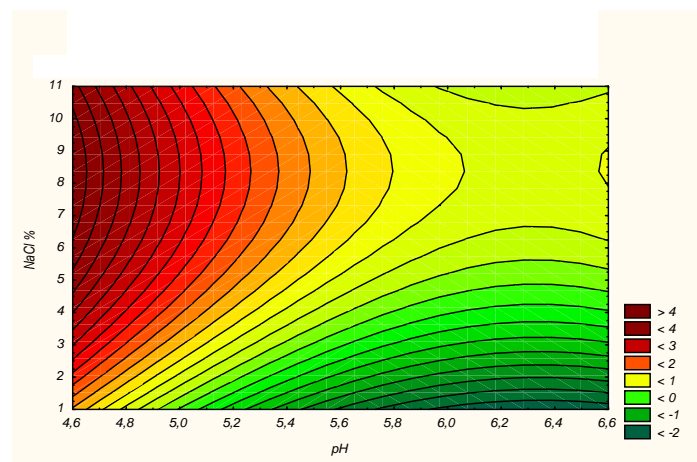
A



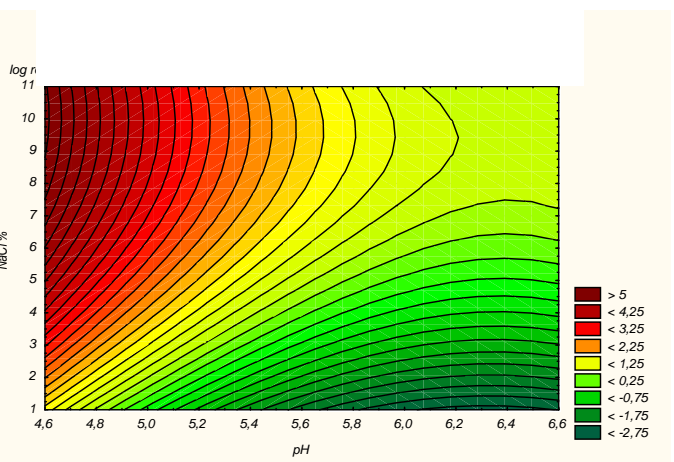
B



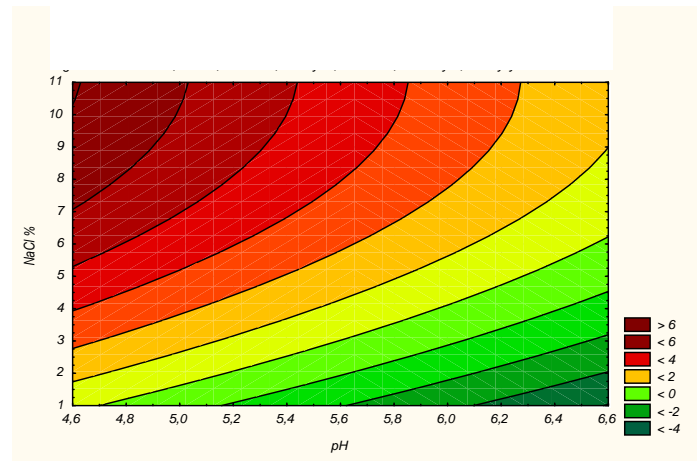
C



D



E



μ 8: μ μ 6179

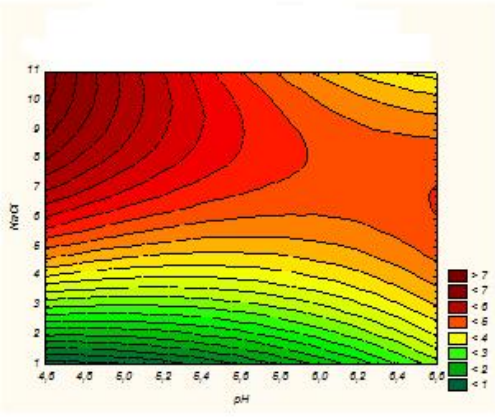
7 C. μ : :2, :4, C: 6, D: 8, E: 13

3.2.2 Επίδραση όξινης καταπόνησης στην επιβίωση της *Listeria monocytogenes* σε συνθήκες όξινης καταπόνησης

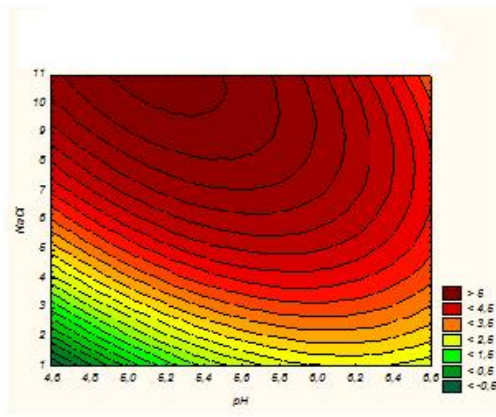
Καθ 'όλη την συντήρηση, και τα δύο στελέχη παρουσίασαν πανομοιότυπη απόκριση στις συνθήκες όξινης καταπόνησης. Σε pH 5.5 έως 6.4 και NaCl 2-4% w / v παρατηρήθηκε και στα δύο στελέχη μικρότερη λογαριθμική μείωση). Από την άλλη πλευρά χαμηλό pH (4.8-5.0) και υψηλή συγκεντρώσεις NaCl (8-10% v / v) είχε ως αποτέλεσμα, για τα δύο στελέχη, να μην υπάρχει επιβίωση έναντι μετέπειτας όξινης καταπόνησης. Παρατηρήθηκε ότι όταν βρίσκονταν στην φάση προσαρμογής δεν υπήρχε επιβίωση ενώ όταν βρίσκονταν στην εκθετική φάση ή στατική τους παρατηρήθηκε επιβίωση

Ίδια εικόνα λαμβάνουμε και από τις ισοϋψείς καμπύλες (Διάγραμμα 9, Διάγραμμα 10) όπου οι συνδυασμοί pH- NaCl συναρτώνται ως προς το βάθος χρόνου. Παρατηρούμε και πάλι ότι κινούμενοι από μικρότερες σε μεγαλύτερες τιμές pH και μικρότερη περιεκτικότητα σε NaCl αυξάνεται η ανθεκτικότητα του παθογόνου στην όξινη καταπόνηση, κάτι το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι όσο μεγαλύτερη τιμή pH και μικρότερη περιεκτικότητα σε NaCl επικρατεί τόσο πιο ευνοϊκές είναι οι συνθήκες για την ανάπτυξη του βακτηρίου.

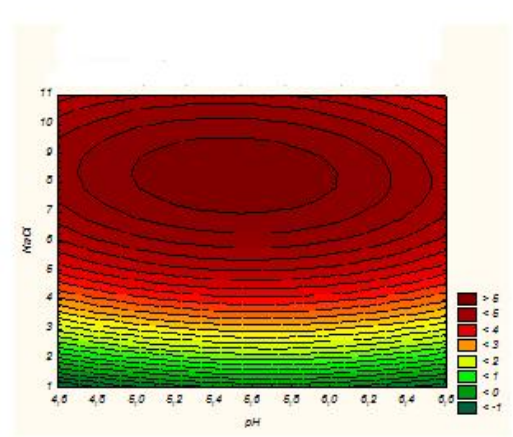
A



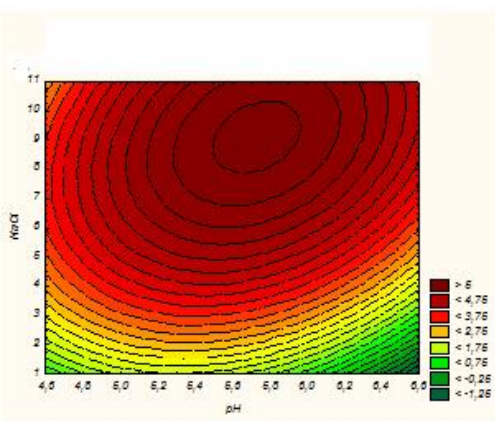
B



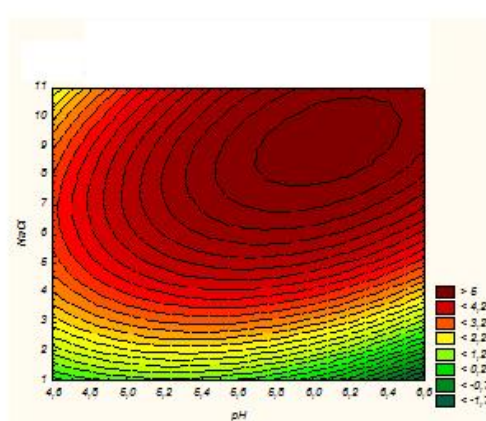
C



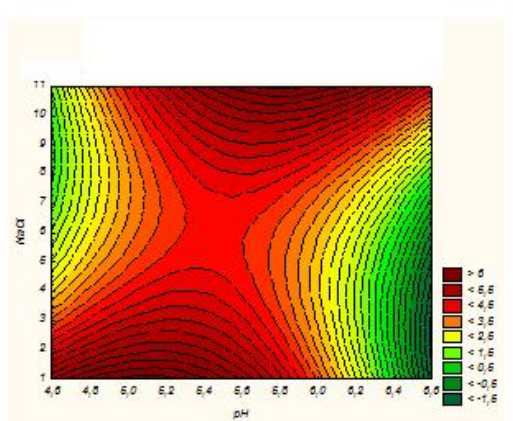
D

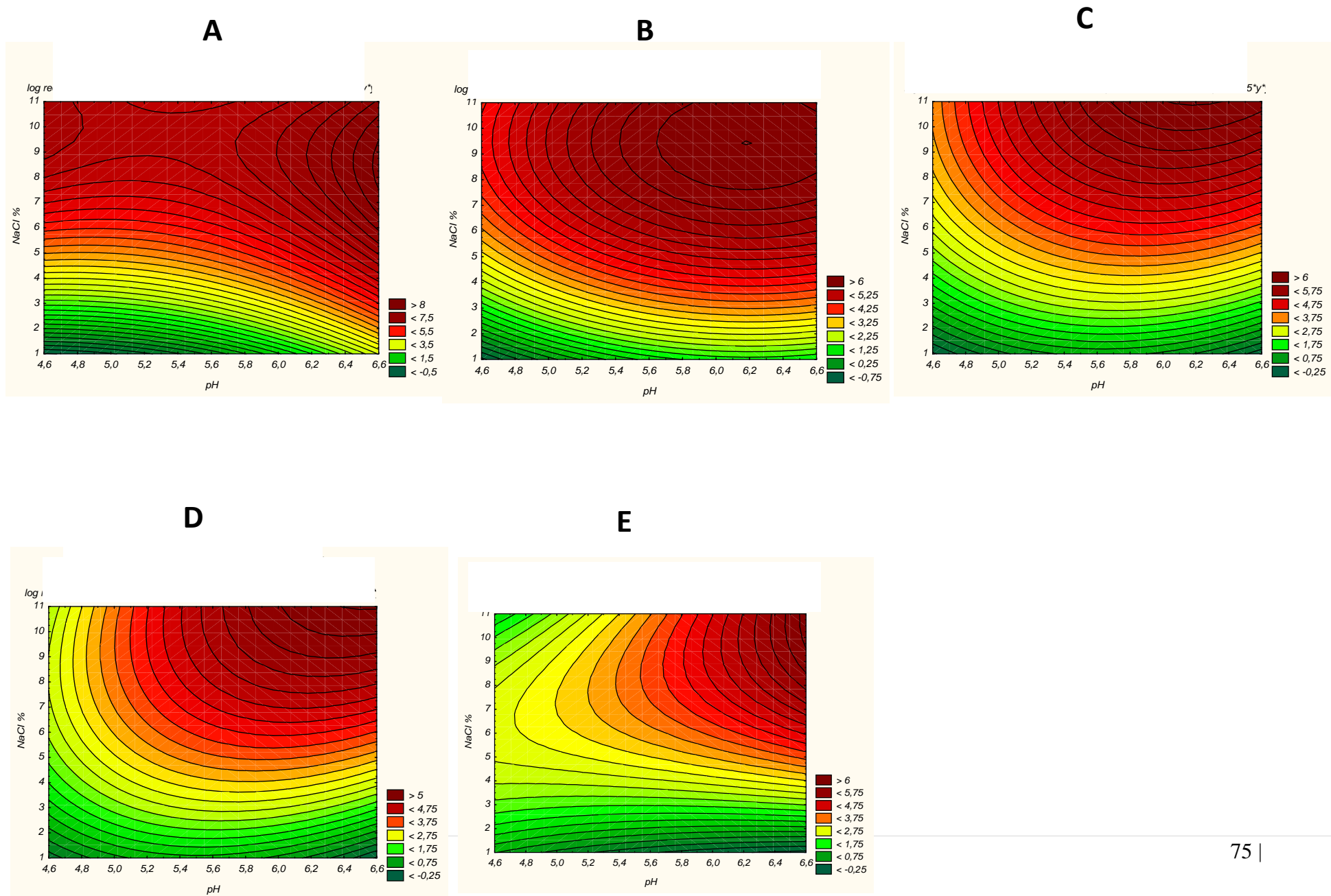


E



F





Διάγραμμα 10 : Λογαριθμική μείωση του στελέχους 6179 (PL2) ύστερα από συνθήκες όξινης καταπόνησης σε TSBYE, pH 2- HCL, 5' σε 37ο C. Ημέρες : A:2, B: 4, C:6, D:8, E:13

3.2.3 Εκτίμηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης των *gad2*, *sigB* και *prfA* κατά τη διάρκεια της συντήρησης

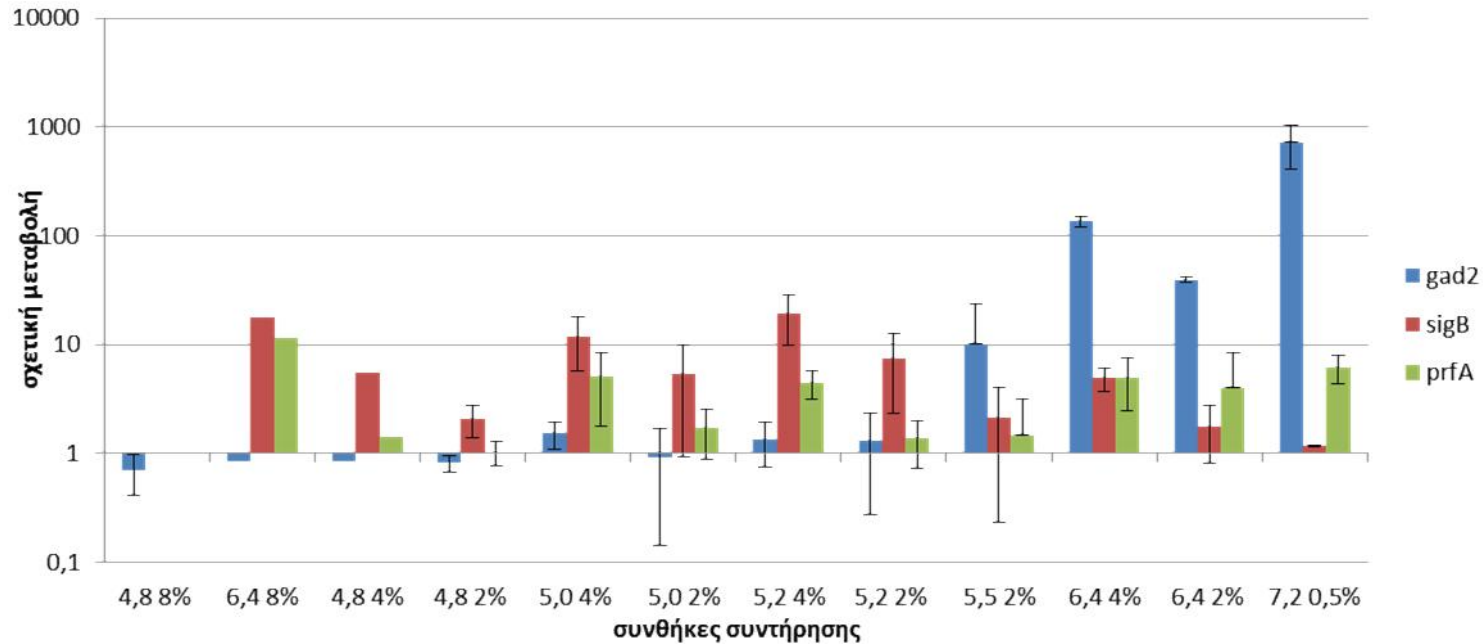
μ
Listeria monocytogenes, μ
 μ μ μ
 μ μ
 μ (real time PCR) μ
 PCR μ SYBR Green I.
 16SrRNA μ
 μ . μ
 1.
 μ μ
 μ μ -μ Pfaffl (Pfaffl,
 2004).
 (*gad2*, *sigB*, *prfA*)
 μ (μ μ),
 μ pH-NaCl μ
 () (μμ 12). μ ,
 10 100 () *gad2*
 pH 5,5 – 6,4 NaCl 2-4% w/V,
 μ TSBYE (pH 7,2,) μ
 μ .
 μ μ
 (pH 2, HCl) μ . *gad2*
 (*glutamate decarboxylase 2*) μ
 μ μ μ
 (Karatzas *et al.*, 2012).

gad2 μ μ
 μ
 (μ μ pH),
 μ μ μ .
 μ μ μ *L.*
monocytogenes μ *sigB*, o μ
 μ μ ,
 μ ,
 μ ,
 , pH 2,5 (Ferreira *et al.*, 2003).
 , o *sigB*, μ
 μ μ *L. monocytogenes*
 μ , μ μ (8°C) (Becker et
 al., 1998, 2000). Utranta et al., (2011)
 μ
 . μ μ μ *sigB*
 μ 10 μ μ
 . *Listeria monocytogenes*,
 PrfA,
 μ μ μ μ ,
 o *prfA* μ μ . μ
 μ , *prfA*
 (4-8% w/V NaCl) μ 30
 μ μ . μ
 μ μ *L.*
monocytogenes μ
 (Sue et al., 2004). μ μ 7°C
 μ , μ
 μ (Bergholz *et al.*, 2012),

25 C
μ
(4.5% NaCl) μ μ
Caco-2 (Olesen *et al.*,
2009). μ μ
Listeria
monocytogenes μ ,
μ ,
μ
μ
μ μ μ μ
(1/2a 4b)
μ μ μ μ μ .

1: μ Real Time PCR

Γονίδιο στόχος	Ορθός εκκινητής (5'-->3')	Ανάστροφος εκκινητής (5'--> 3')	Προϊόν (bp)	Συντελεστής απόδοσης αντίδρασης PCR	Πηγή
<i>gad2</i>	AATACCTTGCCCATGCAGTC	GGCTTGGAATCTTGGATGA	268	1,94	Karatzas <i>et al.</i> , 2010
<i>sigB</i>	TCATCGGTGTCACGGAAGAA	TGACGTTGGATTCTAGACAC	310	1,97	Bae <i>et al.</i> , 2011
<i>prfA</i>	GATACAGAAACATCGGTTGGC	GTGTAATCTTGATGCCATCAGG	340	1,96	Chatterjee <i>et al.</i> , 2006
<i>16srRNA</i>	TGGGGAGCAAACAGGATTAG	TAAGGTTCTTCGCGTTGCTT	213	1,95	Karatzas <i>et al.</i> , 2010



Διάγραμμα 12: : Σχετική μεταβολή της έκφρασης των γονιδίων *gad2* (μπλε), *sigB* (κόκκινο) και *prfA* (πράσινο) κατά την έκτη ημέρα συντήρησης, συγκριτικά με τη δεύτερη ημέρα συντήρησης. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν τη σχετική μεταβολή των επιπέδων έκφρασης για κάθε έναν συνδυασμό pH-NaCl, όπως υπολογίστηκε με το μοντέλο του Pfaffl. Το ενδογενές γονίδιο εναφοράς *16SrRNA* χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Οι γραμμές σφάλματος απεικονίζουν την τυπική απόκλιση στη σχετική έκφραση των γονιδίων μεταξύ δύο βιολογικών επαναλήψεων.

4. Βιβλιογραφία

- Begley, M., Gahan, C. G. M., and Hill, C., 2002. Bile stress response in *Listeria monocytogenes* LO28: Adaptation, cross-protection, and identification of genetic loci involved in bile resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 6005-6012.
- Boerlin, P., Piffaretti, J., 1991. Typing of human, animal, food and environmental isolates of *Listeria monocytogenes* by multilocus enzyme electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1624 – 1629.
- Bubert, A., Riebe, J., Schnitzler, N., Schonberg, A., Goebel, W. and Schubert, P. (1997): Isolation of catalase-negative *Listeria monocytogenes* strains from listeriosis patients and their rapid identification by anti-p60 antibodies and/or PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 179-183
- Chan, Y., Wiedmann, M., 2009. Physiology and genetics of *Listeria monocytogenes* survival and growth at cold temperatures. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49, 237 – 253.
- Cole, M., Jones, M., Holyoak, C., 1990. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology* 69, 63 – 72.
- Donnelly, C. W. (2002): Detection and isolation of *Listeria monocytogenes* from food samples: implications of sub-lethal injury. *Journal of AOAC International* 85, 495-500.
- E. Galdiero (1) (*), M. D'Isanto (2) and F. Aliberti, Effect of saline concentration, pH and growth temperature on the invasive capacity of *Listeria monocytogenes*
- E. Galdiero (1) (*), M. D'Isanto (2) and F. Aliberti, Effect of saline concentration, pH and growth temperature on the invasive capacity of *Listeria monocytogenes*

- E. Galdiero (') (*), M. D'Isanto (2) and F. Aliberti, Effect of saline concentration, pH and growth temperature on the invasive capacity of *Listeria monocytogenes*

- Faleiro, M. L., Andrew, P. W. and Power, D. (2003) Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *International Journal of Food Microbiology*. 84: 207-216.

- Farber, J., Coates, F., Dakey, E., 1992. Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 15, 103 – 105.

- Foster, J. W., (1991). *Salmonella* acid shock proteins are required for the acid tolerance response, *J. Bacteriol.*, 173, 6896.

- Gahan, C. G. M. and Hill, C. (1999): The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 93-100.

- Gahan, C. G. M., and Hill, C., (1999). The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*, *Int. J. Food Microbiol.*, 50, 93

- Gahan, C. G. M., O'Driscoll, B., and Hill, C. (1996). Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk

- Gahan, C. G., O'Mahony, J. and Hill, C. (2001) Characterisation of the *groESL* operon in *Listeria monocytogenes*: utilisation of two reporter systems (*gfp* and *hly*) for evaluating in vivo expression. *Infection and Immunity*. 69: 3924

- Gaze, J., Brown, G., Gaskell, D., Banks, J., 1989. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in homogenates of chicken, beefsteak and carrot. *Food Microbiology* 6, 251 – 259.

- Giotis, E., Mudcharee, J., Wilkinson, B., Blair, I., McDowell, D., 2008. Role of Sigma B factor in the alkaline tolerance of *Listeria monocytogenes* 10403S and cross protection against subsequent ethanol and osmotic stress. *Journal of Food Protection* 71, 1481 – 1485.

- Graves, L., Helsel, L., Steigerwalt, A., Morey, R., Daneshvar, M., Roof, S., Orsi, R., Fortes, E., Millilo, S., den Bakker, H., Wiedmann, M., Swaminathan, B., Sauders, B., 2009. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes

National Forest. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. IJSEM Papers in Press.

- Gray, M., Stafseth, H., Thorp, F., Sholl, L., Riley, W., 1948. A new technique for isolating Listeriellae from the bovine brain. *Journal of Bacteriology* 55, 471 – 476.
- José Miguel Aguilera , 2005. Why food microstructure? , *Jurnal of food Engineering* , 67 3–11
- Kastbjerg, V., Nielsen, D., Arneborg, N., Gram, L., 2009. Response of *Listeria monocytogenes* to disinfection stress at the single – cell and population levels as monitored by intracellular pH measurements and viable cell counts. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 4550 – 4556.
- Koutsoumanis, K. P., Kendall, P. A. and Sofos, J. N. ,2003. Effect of food processing-related stresses on acid tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7514-7516.
- Kroll, R.G., and Patchett, R.A., (1992). Induced acid tolerance in *Listeria monocytogenes*, *Lett. Appl. Microbiol.*, 14, 224.
- Liu, D. (2008) Preparation of *Listeria monocytogenes* specimens for molecular detection and identification. *International Journal of Food Microbiology*. 122: 229-242.
- Lovett J. (1989). *Listeria monocytogenes*. In: MP Doyle, ed. *Foodborne Bacterial Pathogens*. New York: Marcel Dekker Inc., 1989, pp. 284–310.
- M. Antwi, A. H. Geeraerd, K. M. Vereecken 1, R. Jenne´, K. Bernaerts, J. F. Van Impe *,2006. Influence of a gel microstructure as modified by gelatin concentration on *Listeria innocua* growth, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 7 124 – 131
- Mackey, B., Bratchell, N., 1989. The heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 9, 89 – 94.
- Meynel, G.G., and Meynel, E., 1970. *Theory and practice in experimental bacteriology*. 2nd Cambridge University Press.
- Murray, E., Webb, R., Swann, M., 1926. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *Journal of Pathology and Bacteriology* 29, 407 – 439.

- O'Driscoll, B., Gahan, C.G.M., Hill, C., (1997). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis analysis of the acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2679–2685
- Petran, R. L., and Zottola, E. A. (1989): A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Science* 54, 458–460.
- R. A. Ivy, M. Wiedmann, and K. J. Boor, *Listeria monocytogenes*, Grown at 7°C Shows Reduced Acid Survival and an Altered, Transcriptional Response to Acid Shock Compared to *L. monocytogenes* grown at 37°C, Cornell University, Department of Food Science
- Rolf Erik Nilsson, Studies on the Biology of environmentally persistent *Listeria monocytogenes* strains, James Cook University
- Ross, T., Dalgaard, P., Tienungoon, S., 2000. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *International Journal of Food Microbiology* 62, 231 – 246.
- Seeliger, H., Rocourt, J., Schrettenbrunner, A., Grimont, P., Jones, D., 1984. *Listeria ivanovii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34, 336 – 337.
- Shahamat, M., Scaman, A. & Woodbine, M., 1980. Survival of *Listeria monocytogenes* in high salt concentrations. *Zbl. Bakteriologie, Hygiene, I. Abteilung, Originalarbeiten*, 246, 506-511.
- Sutee Wangtueai, Athapol Noomhorm, 2009. Processing optimization and characterization of gelatin from lizardfish (*Saurida* spp.) scales. *Food Engineering and Bioprocess Technology*, 825–834
- Swartz, M. A., Welch, D. F., Narayanan, R. P.; Greenfield, R. A., 1991. Catalase-negative *Listeria monocytogenes* causing meningitis in an adult. Clinical and laboratory features. *American Journal of Clinical Pathology* 96(1), 130-133.
- Tienungoon, S., Ratkowski, D., McMeekin, T., Ross, T., 2000. Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl and lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4979 – 4987
- Vermeulen, A., Gysemans, K., Bernaerts, K., Geeraerd, A., Debever, J., Devlieghere, F., Van Impe, J., 2009. Modelling the influence of the inoculation

level on the growth/no growth interface of *Listeria monocytogenes* as a function of pH, aw and acetic acid. *International Journal of Food Microbiology* 135, 83 – 89.

- Adams M.R., Moss M.O. ,2008. The Royal Society of Chemistry fermentation. *Food Microbiology* 3rd Ed. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3128–3132.

- Becker, L. A., Cetin, M. S., Hutkins, R. W. & Benson, A. K. 1998. Identification of the gene encoding the alternative sigma factor σ_B from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. *J Bacteriol* 180, 4547–4554.

- Becker, L. A., Evans, S. N., Hutkins, R. W. & Benson, A. K. 2000. Role of σ_B in adaptation of *Listeria monocytogenes* to growth at low temperature. *J Bacteriol* 182, 7083–7087.

- Ferreira A, Sue D, O'Byrne CP, and Boor KJ. 2003. Role of *Listeria monocytogenes* σ_B in survival of lethal acidic conditions and in the acquired acid tolerance response. *Appl Environ Microbiol*;69:2692–2698.

- Garner MR, James KE, Callahan MC, Wiedmann M, and Boor KJ. 2006. Exposure to salt and organic acids increases the ability of *Listeria monocytogenes* to invade Caco-2 cells but decreases its ability to survive gastric stress. *Appl Environ Microbiol*;72:5384–5395.

- GMIA (2001). Gelatin information, news, history and more. http://www.gelatin-gmia.com/html/rawmaterials_app.html.

- Ivy, M. Wiedmann, and K. J. Boor , 2012, *Listeria monocytogenes* Grown at 7°C Shows Reduced Acid Survival and an Altered Transcriptional Response to Acid Shock Compared to *L. monocytogenes* grown at 37°C , Cornell University

- Karatzas KA, Suur L, O'Byrne CP. 2012. Characterization of the intracellular glutamate decarboxylase system: analysis of Its function, transcription, and role in the acid resistance of various strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 78(10):3571-9.

- Lahti, E., Johansson, T., Honkanen-Buzalski, T., Hill, P., Nurmi, E., 2001. Survival and detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* during the

manufacture of dry sausage using two different starter cultures. *Food Microbiology* 18, 75–85

- Nissen, H., Holck, A., 1998. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella kentucky* in Norwegian fermented, dry sausage. *Food Microbiology* 15, 273–279.

- Olesen, I., F. K. Vogensen, L. Jespersen. 2009. Gene transcription and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains after exposure to acidic and NaCl stress. *Foodborne Pathog. Dis.* 6:669-680.

- Pfaffl MW.2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*;29:2002–2007.

- Sue D, Fink D, Wiedmann M, and Boor KJ. 2004. σ B-dependent gene induction and expression in *Listeria monocytogenes* during osmotic and acid stress conditions simulating the intestinal environment. *Microbiology*;150:3843–3855.

- Teresa M Bergholz, Barbara Bowen, Martin Wiedmann. 2012. *Listeria monocytogenes* shows temperature dependent and independent responses to salt stress, including responses that induce cross-protection to other stresses., 2602-12. In *Applied and environmental microbiology* 78 (8).

- Thévenot, D., Delignette-Muller, M.L., Christieans, S., Vernozy-Rozand, C., 2005. Fate of *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated French sausages. *International Journal of Food Microbiology* 101, 189–200

- Utratna M, Shaw I, Starr E, O'Byrne CP. 2011. Rapid, transient and proportional activation of σ B in response to osmotic stress in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 77(21):7841-5.