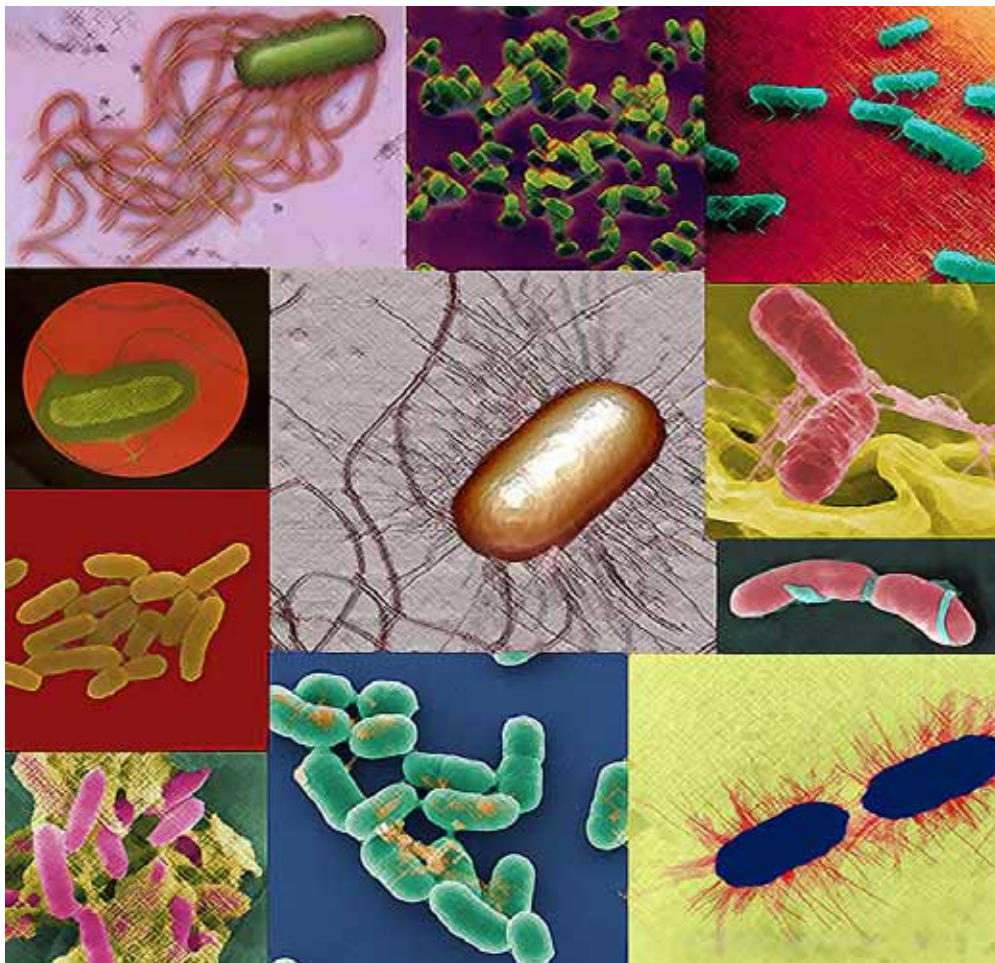


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

**ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ
ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΟΞΥΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΖΥΜΟΥΜΕΝΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ Γ. ΜΠΑΤΣΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2009

ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ Γ. ΜΠΑΤΣΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

*ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ
ΟΞΥΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΖΥΜΟΥΜΕΝΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ*

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Π.Μ.Σ.)
«ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

Επιβλέπων καθηγητής: Δροσινός Ελευθέριος

Εξεταστική Επιτροπή: Δροσινός Ελευθέριος

Κωμαΐτης Μιχαήλ

Πανάγου Ευστάθιος

Παπανικολάου Σεραφείμ

Σκανδάμης Παναγιώτης

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Θα ήθελα να απευθύνω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα αυτής της μεταπτυχιακής ερευνητικής μελέτης και Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων κ. Δροσινό Ελευθέριο, όχι μόνο για την ανάθεση του θέματος και για την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπό μου, όσον αφορά στη σωστή διεκπεραίωση της μεταπτυχιακής μελέτης είτε σε επίπεδο διεξαγωγής των πειραμάτων είτε σε επίπεδο συγγραφής της, αλλά και για την πολύτιμη βοήθεια, καθοδήγηση και εν γένει συμβολή του καθ'όλη τη διάρκεια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να απευθύνω στο Λέκτορα κ. Σκανδάμη Παναγιώτη, μέλος της πενταμελούς συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής, για τις χρήσιμες και καθοριστικές συμβουλές και εύστοχες επισημάνσεις του καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μελέτης. Δε θα μπορούσα να παραλείψω την έκφραση των θερμότερων ευχαριστιών μου στο Δρ. Παραμυθιώτη Σπυρίδωνα, μέλος του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για τη βοήθεια και την ανεκτίμητη συνεισφορά του στην εκπόνηση αυτής της μελέτης και στο Δρ. Ματαράγκα Μάριο για την προθυμία του και τη συμμετοχή του στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία μας και τη δημιουργία ενός ευχάριστου περιβάλλοντος στον εργαστηριακό χώρο αλλά και όλους όσους έμμεσα ή άμεσα συνεισέφεραν στην ολοκλήρωση αυτής της μεταπτυχιακής μελέτης. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες τόσο στους γονείς μου όσο και στους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράσταση και στήριξή τους μέχρι την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής αυτής μελέτης.

Αθανάσιος Γ. Μπάτσος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ABSTRACT.....	2
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.1. Ο παθογόνος μικροοργανισμός <i>Escherichia coli</i>	5
1.1.1. Εισαγωγή και ιστορικά στοιχεία.....	5
1.1.2. Ο μικροοργανισμός και τα χαρακτηριστικά του.....	6
1.1.3. Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά.....	8
1.1.3.1. Εντεροτοξινογόνα στελέχη <i>E. coli</i> (ETEC).....	8
1.1.3.2. Εντεροδιεισδυτικά στελέχη <i>E. coli</i> (EIEC).....	9
1.1.3.3. Εντεροπαθογόνα στελέχη <i>E. coli</i> (EPEC).....	10
1.1.3.4. Εντεροαιμορραγικά στελέχη <i>E. coli</i> (EHEC).....	11
1.1.3.5. Εντεροαθροιστικά στελέχη <i>E. coli</i> (EAEC)	14
1.1.4. Συσχετισμός με τα τρόφιμα	15
1.2. Επιβίωση του μικροοργανισμού <i>E. coli</i> υπο συνθήκες όξινης καταπόνησης	17
1.2.1. Μηχανισμοί αντίδρασης στην περιβαλλοντική αλλαγή	17
1.2.2. Συστήματα ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση.....	19
1.2.2.1. Σύστημα οξεοανθεκτικότητας 1 (Acid Resistance system 1 - AR1).....	19
1.2.2.2. Σύστημα οξεοανθεκτικότητας 2 (Acid Resistance system 2 – AR2)	20
1.2.2.3. Σύστημα οξεοανθεκτικότητας 3 (Acid Resistance system 3 – AR3)	22
1.3. Ο παθογόνος μικροοργανισμός <i>Listeria monocytogenes</i>	25
1.3.1 Εισαγωγή και ιστορικά στοιχεία.....	25
1.3.2. Ο μικροοργανισμός και τα χαρακτηριστικά του.....	25
1.3.3. Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά.....	26
1.3.4. Συσχετισμός με τα τρόφιμα	29
1.4. Επιβίωση του μικροοργανισμού <i>L. monocytogenes</i> υπο συνθήκες όξινης καταπόνησης.....	31

1.4.1. Το σύστημα GAD και ο ρόλος του παράγοντα σ^B στη ρύθμισή του.....	32
1.4.2. Το σύστημα απαμινάσης της αργινίνης	34
1.5. Ο παθογόνος μικροοργανισμός <i>Salmonella</i> spp.	35
1.5.1 Εισαγωγή και ιστορικά στοιχεία.....	35
1.5.2. Ο μικροοργανισμός και τα χαρακτηριστικά του.....	36
1.5.3. Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά.....	37
1.5.4. Συσχετισμός με τα τρόφιμα	39
1.6. Επιβίωση του μικροοργανισμού <i>Salmonella</i> spp. υπο συνθήκες όξινης καταπόνησης.....	40
1.7. Ο παθογόνος μικροοργανισμός <i>Yersinia enterocolitica</i>	42
1.7.1 Εισαγωγή και ιστορικά στοιχεία.....	42
1.7.2. Ο μικροοργανισμός και τα χαρακτηριστικά του.....	43
1.7.3. Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά.....	44
1.7.4. Συσχετισμός με τα τρόφιμα	45
1.8. Επιβίωση του μικροοργανισμού <i>Yersinia enterocolitica</i> υπο συνθήκες όξινης καταπόνησης.....	47
1.9. Πρωτεομική (Proteomics)	48
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	51
2.1. Αναλώσιμα υλικά	51
2.1.1. Ανόργανα και οργανικά χημικά αντιδραστήρια	51
2.1.2. Θρεπτικά υποστρώματα.....	52
2.2. Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	53
2.3. Μικροβιακά στελέχη.....	54
2.4. Πειραματική διαδικασία	55
2.4.1. Ανανέωση των μικροοργανισμών.....	55
2.4.2. Ενοφθαλμισμός.....	56
2.4.3. Παραλαβή βιομάζας και όξινη καταπόνηση.....	57
2.4.4. Έκπλυση βιομάζας.....	59
2.4.5. Λύση των βακτηριακών κυττάρων	60

2.4.6. Μέθοδος Bradford προσδιορισμού πρωτεϊνών	60
2.4.7. Κατακρήμνιση με τριχλωροξικό οξύ (TCA)	61
2.4.8. Ανάκτηση πρωτεΐνης	62
2.4.9. Διαδικασία ηλεκτροφόρησης πηκτής δύο διαστάσεων	62
2.4.9.1. Προετοιμασία του δείγματος	62
2.4.9.2. Ισοηλεκτρικός εστιασμός.....	63
2.4.9.3. Προετοιμασία για τη δεύτερη διάσταση.....	64
2.4.9.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κατά Μοριακό Βάρος.....	66
2.4.10. Εμφάνιση πρωτεϊνών	67
2.4.10.1. Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμιδίου	68
2.4.10.2. Αποχρωματισμός των πηκτών	68
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	70
3.1. Επίδραση των πειραματικών συνθηκών επί του στελέχους <i>Escherichia coli</i>	
ATCC 25922	70
3.1.1. Ανάπτυξη του στελέχους <i>E. coli</i> ATCC 25922 χωρίς να έχει προηγηθεί προσαρμογή σε συνθήκες όξινης καταπόνησης	70
3.1.2. Ανάπτυξη του στελέχους <i>E. coli</i> ATCC 25922 κατόπιν προσαρμογής σε συνθήκες όξινης καταπόνησης – Σύγκριση με συνθήκες μη προσαρμογής.....	76
3.1.3. Συζήτηση.....	79
3.1.4. Επίδραση στο πρωτέωμα	83
3.1.4.1. Δείκτης μοριακών βαρών και αποτύπωση πρωτεϊνικής σύστασης	83
3.1.4.2. Πρωτεϊνική κατατομή σε συνθήκες μη προσαρμογής.....	84
3.1.4.3. Πρωτεϊνική κατατομή σε συνθήκες όξινης προσαρμογής.....	85
3.1.4.4. Σύγκριση μεταξύ συνθηκών προσαρμογής και μη προσαρμογής και ταυτοποίηση πρωτεϊνών.....	86
3.2. Επίδραση των πειραματικών συνθηκών επί του στελέχους <i>Listeria</i>	
<i>monocytogenes</i> LQC 15015.....	92
3.2.1. Ανάπτυξη του στελέχους <i>L. monocytogenes</i> LQC 15015 χωρίς να έχει προηγηθεί προσαρμογή σε συνθήκες όξινης καταπόνησης.....	92
3.2.2. Ανάπτυξη του στελέχους <i>L. monocytogenes</i> LQC 15015 κατόπιν προσαρμογής σε συνθήκες όξινης καταπόνησης – Σύγκριση με συνθήκες μη προσαρμογής.....	96
3.2.3. Συζήτηση.....	100

3.2.4. Επίδραση στο πρωτέωμα	105
3.2.4.1. Πρωτεϊνική κατατομή σε συνθήκες μη προσαρμογής.....	105
3.2.4.2. Πρωτεϊνική κατατομή σε συνθήκες όξινης προσαρμογής.....	106
3.2.4.3. Σύγκριση μεταξύ συνθηκών προσαρμογής και μη προσαρμογής και ταυτοποίηση πρωτεϊνών.....	107
3.3. Επίδραση των πειραματικών συνθηκών επί του στελέχους <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium LQC 15100	111
3.3.1. Ανάπτυξη του στελέχους <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium LQC 15100 χωρίς να έχει προηγηθεί προσαρμογή σε συνθήκες όξινης καταπόνησης	111
3.3.2. Ανάπτυξη του στελέχους <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium LQC 15100 κατόπιν προσαρμογής σε συνθήκες όξινης καταπόνησης – Σύγκριση με συνθήκες μη προσαρμογής	115
3.3.3. Συζήτηση.....	119
3.3.4. Επίδραση στο πρωτέωμα	123
3.3.4.1. Πρωτεϊνική κατατομή σε συνθήκες μη προσαρμογής.....	123
3.3.4.2. Πρωτεϊνική κατατομή σε συνθήκες όξινης προσαρμογής.....	124
3.3.4.3. Σύγκριση μεταξύ συνθηκών προσαρμογής και μη προσαρμογής και ταυτοποίηση πρωτεϊνών.....	125
3.4. Επίδραση των πειραματικών συνθηκών επί του στελέχους <i>Yersinia enterocolitica</i> CITY 650	130
3.4.1. Ανάπτυξη του στελέχους <i>Y. enterocolitica</i> CITY 650 χωρίς να έχει προηγηθεί προσαρμογή σε συνθήκες όξινης καταπόνησης.....	130
3.4.2. Ανάπτυξη του στελέχους <i>Y. enterocolitica</i> CITY 650 κατόπιν προσαρμογής σε συνθήκες όξινης καταπόνησης – Σύγκριση με συνθήκες μη προσαρμογής.....	134
3.4.3. Συζήτηση.....	138
3.4.4. Επίδραση στο πρωτέωμα	141
3.4.4.1. Πρωτεϊνική κατατομή σε συνθήκες μη προσαρμογής.....	141
3.4.4.2. Πρωτεϊνική κατατομή σε συνθήκες όξινης προσαρμογής.....	142
3.3.4.3. Σύγκριση μεταξύ συνθηκών προσαρμογής και μη προσαρμογής και ταυτοποίηση πρωτεϊνών.....	143
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	147
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	151

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο προσδιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου των κυττάρων τεσσάρων στελεχών τροφιμογενών παθογόνων βακτηρίων (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* LQC 15015, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 και *Yersinia enterocolitica* CITY 650) τα οποία έχουν υποστεί προσαρμογή σε συνθήκες ήπια όξινης καταπόνησης. Παράλληλα η παρούσα μελέτη πραγματεύεται τη διερεύνηση της επίδρασης των προαναφερθέντων συνθηκών ήπιας όξινης προσαρμογής επί της φυσιολογίας των κυττάρων των μικροοργανισμών σε συνθήκες όξινης καταπόνησης.

Προκειμένου για τον προσδιορισμό του πρωτεϊνικού περιεχομένου των κυττάρων των τεσσάρων μικροοργανισμών, αρχικά απομονώνονται οι πρωτεΐνες των αντίστοιχων κυτταρικών καλλιιεργειών ενώ έπεται ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2-D PAGE), η οποία οδηγεί στην αποτύπωση της πρωτεϊνικής σύστασης του μικροοργανισμού επάνω σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, διαμορφώνοντας ένα «πρωτεϊνικό χάρτη» των συνθηκών προσαρμογής και μη. Όσον αφορά στη διερεύνηση της επίδρασης των συνθηκών ήπιας όξινης καταπόνησης, στη φυσιολογία των κυττάρων των μικροοργανισμών και στην εν γένει ανθεκτικότητά τους, πραγματοποιήθηκε έκθεση τους σε διάφορες τιμές pH (4 έως 7) και ενεργότητας νερού (a_w από 0.942 έως 0.977). Αυτό επιτυγχάνεται με προσδιορισμό της ανάπτυξης των μικροοργανισμών με χρήση των λεγόμενων microplates και της μεθόδου της οπτικής πυκνότητας (Optical Density - O.D.) στα 620 nm. Από τη σύγκριση της ανάπτυξης σε υποστρώματα με διαφορετικούς συνδυασμούς pH- a_w , κατόπιν επίδρασης συνθηκών ήπιας όξινης προσαρμογής αλλά και μη επίδρασης, προκύπτει ότι μεταξύ όλων των μικροβιακών στελεχών που μελετήθηκαν μόνο το στέλεχος *Listeria monocytogenes* LQC 15015 κατάφερε να αυξήσει την οξεοανθεκτικότητά και την ωσμοανθεκτικότητά του μετά την επίδραση των συνθηκών προσαρμογής.

ABSTRACT

Aim of present study is the determination of the protein content of cells of four foodborne pathogen bacterial strains (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* LQC 15015, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 and *Yersinia enterocolitica* CITY 650) which have been subjected to adaptation in mild acidic conditions. At the same time the present study deals with the investigation of the effect of aforementioned conditions of mild acidic adaptation, on the physiology of microorganisms' cells in acidic conditions.

With regard to the determination of protein content of cells of four microorganisms, proteins are initially isolated from the corresponding cellular cultures while two dimensions polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) is the method used, leading to the imprinting of protein content of microorganisms on polyacrylamide gel, creating the form of a "protein map" specific for each condition (adapted or not adapted cultures). With regard to the investigation of the effect of mild acidic conditions on the physiology of microorganisms' cells and on the induction of acid resistance, exposure to various pH (4 up to 7) and water activity (a_w from 0.942 to 0.977) values were performed. This is achieved with determination of growth of microorganisms with the use of both microplates and method of optical density (Optical Density - O.D.) in 620 nm wavelength. Whether adaptation to mild acidic conditions has been applied or not, from the comparison of growth in substrates with different pH – a_w combinations it can be concluded that among all four tested strains only *Listeria monocytogenes* LQC 15015 was able to increase its acid tolerance and osmotolerance after application of the aforementioned mild acidic conditions.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Σε κάθε μέρος του κόσμου, οι άνθρωποι δίνουν μια συνεχή μάχη ενάντια στην επιμόλυνση των τροφίμων, των τροφιμογενών ασθενειών και της απόρριψης ακατάλληλων πρὸς βρώση τροφίμων. Η παρατήρηση από επιδημιολογικής απόψεως των προηγούμενων δύο έως τριών δεκαετιών, έχει να παρουσιάσει όχι μόνο μια αύξηση της επικράτησης τροφιμογενών ασθενειών, αλλά και ένα τεράστιο αριθμό κρουσμάτων που προκλήθηκαν από ασθένειες όπως η σαλμονέλλωση, η χολέρα, οι μολύνσεις από εντεροαιμορραγικά στελέχη *E. coli* (EHEC) και η ηπατίτιδα Α, σε αναπτυσσόμενες και αναπτυσσόμενες χώρες. Επιπλέον, η χολέρα και άλλες διαρροϊκές ασθένειες, ιδιαίτερα εκείνη των νηπίων, που παραδοσιακά θεωρούνταν ότι μεταδίδονται από το νερό ή μέσω της διαπροσωπικής επαφής, αποδείχθηκαν κατά ένα μεγάλο μέρος τροφιμογενείς. Στις βιομηχανικές χώρες, διάφορες μελέτες επικινδυνότητας παρουσίασαν απροσδόκητα υψηλά ποσοστά τροφιμογενών ασθενειών κοντά στο 10 με 15% του πληθυσμού. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, αυτός ο αριθμός μπορεί να αγγίζει και το 25 με 30% (Mead et al., 1999). Κάποιος μπορεί να υποθέσει με μικρό περιθώριο σφάλματος, ότι αυτός ο αριθμός είναι υψηλότερος κατά πολύ στις αναπτυσσόμενες χώρες, και οι επιπτώσεις στην υγεία πιο δριμύες.

Εκτός των άλλων τα προβλήματα της ασφάλειας των τροφίμων θα μαστίζουν την ανθρωπότητα κατά τον 21^ο αιώνα, ειδικά τώρα που διάφορες αλλαγές παγκοσμίως συνεχίζουν να επηρεάζουν αρνητικά την ασφάλεια των τροφίμων και του πόσιμου νερού. Τέτοιες αλλαγές περιλαμβάνουν την αύξηση του πληθυσμού, την αστικοποίηση, τη φτώχεια, το διεθνές εμπόριο των τροφίμων και ζωοτροφών, το διεθνή τουρισμό ενώ αλλαγές κατά τη διάρκεια των τελευταίων 20 ετών, έχουν επέλθει και στην επιδημιολογία των τροφιμογενών ασθενειών με κυριότερους παράγοντες που έχουν συμβάλει σ' αυτή την αλλαγή, την ευαισθησία των ξενιστών, διάφορες νέες ζωοανθρωπονόσους και την αντιμικροβιακή ανθεκτικότητα. Το κόστος των συνεπειών που επιφέρονται από τις τροφιμογενείς ασθένειες είναι τεράστιο και αφορά όχι μόνο στα μεμονωμένα άτομα και στην κοινωνία σα σύνολο, η οποία «βλέπει» μια μείωση της ολικής παραγωγικότητας και αύξηση των θανάτων, αλλά και στις βιομηχανίες τροφίμων οι οποίες είναι αναγκασμένες υπό το βάρος των περιστάσεων να αποσύρουν τεράστιες ποσότητες τροφίμων ή να πραγματοποιούν χρονοβόρους και δαπανηρούς εργαστηριακούς ελέγχους προκειμένου να

εξασφαλίζουν ότι τα προϊόντα τους είναι όσο το δυνατόν πιο απαλλαγμένα από επικίνδυνους παθογόνους μικροοργανισμούς.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

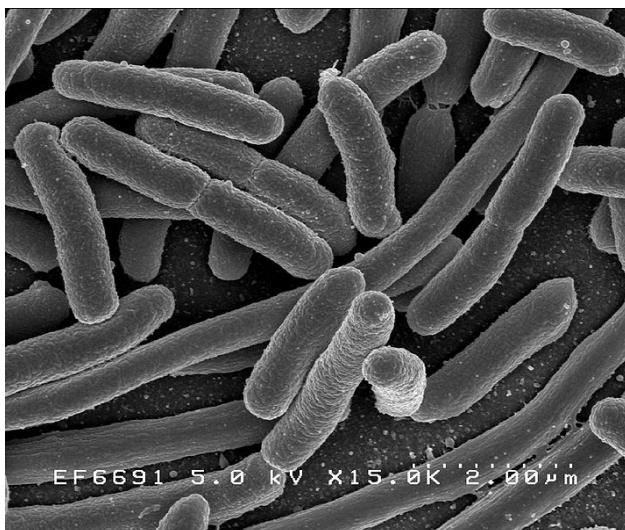
1.1. Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Escherichia coli*

1.1.1. Εισαγωγή και ιστορικά στοιχεία

Από το 1885 οπότε και απομονώθηκε αρχικά από τα παιδικά περιττώματα και περιγράφηκε από το γερμανό μικροβιολόγο Theodor Escherich, η επιστημονική προσοχή έχει υπερεστιαστεί στο μικροοργανισμό *Escherichia coli* σε τέτοιο βαθμό ώστε σήμερα να θεωρείται πιθανώς ο πιο μελετημένος μικροοργανισμός. Η *E. coli* είναι σχεδόν μόνιμος κάτοικος του εντέρου των ανθρώπων και άλλων θερμόαιμων ζώων όπου παρότι αποτελεί μόνο ένα μικρό μέρος της συνολικής μικροχλωρίδας είναι ο κυρίαρχος προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός. Παρά το γεγονός ότι ως συμβιώτης είναι γενικά αβλαβής, μπορεί να είναι ένα καιροσκοπικό παθογόνο προκαλώντας διάφορες μολύνσεις όπως Gram-αρνητική σηψαιμία, μολύνσεις μέρους της ουροδόχου κύστεως, πνευμονία σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς καθώς και μηνιγγίτιδα στα νεογνά. Το κοινό φαινόμενο της παρουσίας της στα περιττώματα, ο γενικά μη παθογενής χαρακτήρας της, και τα χαρακτηριστικά επιβίωσης της στο νερό οδήγησαν στην υιοθέτηση του μικροοργανισμού *E. coli* ως δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης και πιθανής παρουσίας εντερικών παθογόνων όπως το βακτήριο *Salmonella typhi* στο νερό. Αυτή η χρήση έχει μεταφερθεί στα τρόφιμα όπου μεγαλύτερη προσοχή απαιτείται στην ερμηνεία της σημασίας των θετικών αποτελεσμάτων. Στελέχη *E. coli* αναγνωρίστηκαν αρχικά ως αίτια της γαστρεντερίτιδας στα νήπια της Αγγλίας στη διάρκεια του θέρους του 1940. Έως το 1982, τα στελέχη που ευθύνονται για τη διάρροια ταξινομήθηκαν σε τρεις τύπους βασισμένους στην ικανότητά τους για πρόκληση ασθενειών (virulence):

- ❖ Εντεροπαθογόνα στελέχη *E. coli* (enteropathogenic *E. coli* - EPEC),
- ❖ Εντεροδιεισδυτικά στελέχη *E. coli* (enteroinvasive *E. coli* - EIEC), και
- ❖ Εντεροτοξινογόνα στελέχη *E. coli* (enterotoxigenic *E. coli* - ETEC).

Δεν είναι πολύ κοινές αιτίες τροφιμογενούς ασθένειας στις αναπτυγμένες χώρες, αλλά σίγουρα αποτελούν μια σημαντική αιτία παιδικής διάρροιας στις λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες. Τα εντεροτοξινογόνα στελέχη *E. coli* (ETEC) συχνά συνδέονται με την αποκαλούμενη διάρροια του ταξιδιώτη. Επιπλέον από το 1982, τα εντεροαιμορραγικά στελέχη *E. coli* (EHEC) και ιδιαίτερα ο ορότυπος O157:H7 έχει αναγνωριστεί ως αίτιο επιδημιολογικών εξάρσεων αιμορραγικής κολίτιδας και αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου (haemolytic-uremic syndrome - HUS), ιδιαίτερα στη Βόρεια Αμερική, όπου τρόφιμα όπως ο μη επαρκώς ψημένος κιμάς, το νωπό γάλα και οι φρέσκοι χυμοί έχουν εμπλακεί.



Εικόνα 1. Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο που απεικονίζει τους βακίλλους του βακτηρίου *E.coli*. http://www3.niaid.nih.gov/topics/BiodefenseRelated/Biodefense/PublicMedia/image_library.htm

Μια εκθετική άνοδος των κρουσμάτων του ορότυπου O157:H7 αναφέρθηκε στον Καναδά μεταξύ 1982 και 1986 και μια σχετική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο μεταξύ 1985 και 1988 έδειξε ότι η αύξηση αυτή αποτελούσε πραγματικό γεγονός και εκεί (118 στην Αγγλία και την Ουαλία και 86 στη Σκωτία). Ο αριθμός των κρουσμάτων στο Ηνωμένο Βασίλειο συνέχισε να

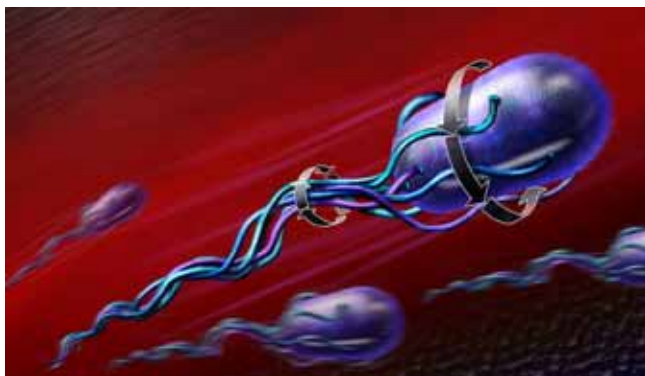
αυξάνεται έως το 1997 και έκτοτε κυμαίνεται μεταξύ 600 και 1000 κρουσμάτων το χρόνο. Δύο ακόμα τύποι του βακτηρίου *E. coli* αναγνωρίστηκαν ως διαρροϊκές αιτίες πρωτίστως στα παιδιά (Enterο-aggregative *E. coli* – EaggEC και diffusely adherent *E. coli* - DAEC) (Giron *et al.*, 1991· Nataro και Kaper, 1998) και δρουν μέσω προσκόλλησης στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Η εμφάνιση αυτών των οροτύπων της *E.coli* απεικονίζει με μεγάλη άνεση την «ευπλαστότητα» του γονιδιώματος του μικροοργανισμού. Η απόκτηση, η απώλεια ή η αναδιοργάνωση των γενετικών στοιχείων εισάγουν νέα χαρακτηριστικά παθογένειας και ικανότητας για προσβολή.

1.1.2. Ο μικροοργανισμός και τα χαρακτηριστικά του

Το βακτήριο *E. coli* είναι ένα Gram-αρνητικό προαιρετικά αναερόβιο και μη σποριογόνο βακτήριο το οποίο ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Είναι θετικό στην καταλάση και αρνητικό στο τέστ της οξειδάσης ενώ τα κύτταρα έχουν μήκος περίπου 2 μικρόμετρα (μm) και 0.5 μm διάμετρο και όγκο 0.6 - 0.7 μm^3 (Kubitschek 1990) και η κίνησή τους υποβοηθείται από περίτριχα μαστίγια που διαθέτουν γύρω από το κύριο σώμα του βακίλλου. Μπορεί να επιβιώσει και να αναπτυχθεί σε μια πληθώρα υποστρωμάτων ενώ υπό αναερόβιες συνθήκες παράγει γαλακτικό οξύ, αιθανόλη, οξικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα. Λόγω του ότι πολλά μεταβολικά μονοπάτια απελευθερώνουν υδρογόνο ο μικροοργανισμός *E. coli* συμβιώνει με μεθανογενετικούς μικροοργανισμούς ή θειοαναγωγικά βακτήρια

προκειμένου οι δεύτεροι να μειώνουν τα επίπεδα υδρογόνου (Madigan και Martinko 2006) και να καθιστούν το περιβάλλον πιο ευνοϊκό για την ανάπτυξη της *E. coli*.

Το βακτήριο *E. coli* μπορεί να διαφοροποιηθεί από άλλα μέλη της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* στη βάση βιοχημικών δοκιμών. Παραδοσιακά μια σημαντική ομάδα δοκιμών χρησιμοποιούμενων για αυτόν το λόγο είναι γνωστή από το αρκτικόλεξο **IMViC**. Αυτό το τεστ εξετάζει



Εικόνα 2. Τα κύτταρα της *Escherichia coli* κινούνται με τη χρήση μαστιγίων που παράγουν ροπή για να περιστρέψουν το βακτήριο δεξιόστροφα.
http://www.nsf.gov/news/news_images.jsp?

τη δυνατότητα των μικροοργανισμών να:

- (i) παράγουν ινδόλη από τρυπτοφάνη (I)
- (ii) παράγουν επαρκή ποσότητα οξέος για να μειωθεί το pH του μέσου κάτω από 4.4 που είναι και το ισοδύναμο σημείο του δείκτη ερυθρό του μεθυλίου (M),
- (iii) παράγουν ακετοΐνη (ακετυλομεθυλοκαρβινόλη (carbinol acetylmethyl)) (V) και
- (iv) να χρησιμοποιήσουν το κιτρικό οξύ (C).

Πίνακας 1. Η δοκιμή IMViC

	Ινδόλη	Ερυθρό του Μεθυλίου	Voges Proskauer	Κιτρικό οξύ
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-
<i>Shigella</i>	V	+	-	-
<i>Salmonella Typhimurium</i>	-	+	-	+
<i>Citrobacter freundii</i>	-	+	-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	+	+

Δεδομένου ότι η παραγωγή οξέων και ακετυλομεθυλοκαρβινόλης είναι εναλλακτικές οδοί για το μεταβολισμό του πυροσταφυλικού οξέος, τα περισσότερα είδη των εντεροβακτηριδίων είναι θετικά είτε στο VP τεστ είτε στο ερυθρό του μεθυλίου. Στη δοκιμή IMViC, τα περισσότερα στελέχη *E. coli* είναι θετικά στο τεστ της ινδόλης και του ερυθρού του μεθυλίου και αρνητικά στα τεστ VP και κιτρικού οξέος (Πίνακας 1).

Οι δοκιμές χρησιμοποιούνται ακόμα και σήμερα για λόγους ταυτοποίησης συνήθως όμως ως τμήμα μιας σειράς εξετάσεων που πραγματοποιούνται στα σύγχρονα συστήματα δοκιμών.

Ο μικροοργανισμός *E. coli* είναι ένα χαρακτηριστικό μεσόφιλο βακτήριο με ανάπτυξη από 7-10°C μέχρι 50°C με βέλτιστο περίπου στους 37°C, αν και έχουν υπάρξει αναφορές για μερικά εντεροτοξινογόνα στελέχη (ETEC) που αυξάνονται ακόμα και σε θερμοκρασίες της τάξης των 4°C. Δεν παρουσιάζει καμία αξιοσημείωτη θερμοανθεκτικότητα (D_{60} ισούται με 0.1 min.) και μπορεί να επιζήσει υπό κατάψυξη για εκτεταμένες περιόδους. Το βέλτιστο pH ανάπτυξής του είναι κοντά στο ουδέτερο αλλά η αύξηση είναι δυνατή ακόμα και κάτω από το pH 4.4 υπό ειδήλλως βέλτιστες συνθήκες. Ελάχιστη τιμή ενεργότητας νερού (a_w) για την αύξηση είναι το 0.95. Ένα σχέδιο ταξινόμησης ανά ορότυπο για την *E.coli* βασισμένο στο **σωματικό λιποπολυσακχαρίτη O**, **μαστίγιο H**, και πολυσακχαρίτη καψιδίου **αντιγόνου K** προτάθηκε από τον Kauffman τη δεκαετία του '40. Στις μέρες μας εφαρμόζεται το O:H σύστημα κατά το οποίο οι κύριες οροομάδες καθορίζονται από τα αντιγόνα O και υποδιαιρούνται έπειτα σε ορότυπους βάσει των αντιγόνων H. Οπότε τα διάφορα στελέχη του παθογόνου *E. coli* τείνουν να εμπίπτουν σε κάποιο από τους ορότυπους O:H, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται το έργο της ταυτοποίησης και ανίχνευσης των παθογόνων καθώς επίσης και οι διάφορες επιδημιολογικές έρευνες.

1.1.3. Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά

Τέσσερις είναι οι κύριες κατηγορίες διαρροϊκών στελεχών *E. coli* βάσει της λοιμοτοξικότητάς τους (virulence).

1.1.3.1. Εντεροτοξινογόνα στελέχη *E. coli* (ETEC).

Η ασθένεια που προκαλείται από την ETEC εμφανίζεται συνήθως μεταξύ 12 και 36 ωρών μετά από την κατάποση του οργανισμού. Τα συμπτώματα μπορούν να κυμανθούν από μια ήπια απύρετη διάρροια ως μια οξεία αντίδραση σαν αυτές που εμφανίζονται στην περίπτωση της χολέρας (εντεροτοξίνη που παράγεται από το *Vibrio cholerae*) (Sixma et al., 1993) χωρίς όμως έκκριση αίματος ή βλέννας και παράλληλα με στομαχικούς πόνους και εμετό. Η ασθένεια συνήθως περιορίζεται από μόνη της μετά την παρέλευση ικανού χρονικού διαστήματος συνήθως 2-3 ημέρες, αν και στις αναπτυσσόμενες χώρες είναι μια κοινή αιτία της παιδικής διάρροιας όπου μπορεί να προκαλέσει σοβαρή αφυδάτωση.

Δύο τύποι τοξινών παράγονται: οι σταθερές κατά τη θέρμανση τοξίνες (ST), που μπορούν να αντέξουν στη θέρμανση (100°C για 15 min.) και στην παρουσία οξέων, και οι ασταθείς στη θέρμανση (LT) που αδρανοποιούνται σε θερμοκρασίες της τάξης των 60°C μετά από 30 min. και σε χαμηλό pH. Η τοξίνη LTI φέρει μια ισχυρή ομοιότητα με την τοξίνη της χολέρας αφού αποτελείται από πέντε υπομονάδες B (με μοριακό βάρος 11.5 kDa) (Clemens et al., 1988) που είναι υπεύθυνες για τη σύνδεση της τοξίνης στα επιθηλιακά κύτταρα και μια υπομονάδα A (με μοριακό βάρος 25 kDa) που μεταφέρεται στα επιθηλιακά κύτταρα όπου και ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση (cyclase adenylate) (Tauschek et al., 2002). Η συνεπακόλουθη αύξηση στα επίπεδα της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) εμποδίζει τα ιόντα Na⁺, Cl⁻ και νερού να απορροφηθούν από τα κύτταρα ενώ μάλιστα υποβοηθεί την απώλειά τους από τα εντερικά κύτταρα με αποτέλεσμα ο οργανισμός να οδηγείται σε υδατώδη διάρροια μεγάλων ποσοτήτων. Η τοξίνη LTII που παράγεται από ορισμένα στελέχη ETEC αναπτύσσει παρόμοια βιολογική δραστηριότητα με την LTI αλλά δεν έχει τα ίδια κλίμακας δυσμενή αποτελέσματα.

Δύο τύποι ST τοξινών έχουν αναγνωριστεί με πιο κοινή την ST_A, η οποία είναι χαμηλού μοριακού βάρους, ένα μικρό αντιγονικό πολυπεπτίδιο με λιγότερα από 20 αμινοξέα που παράγεται από ένα πρόδρομο μόριο 72 αμινοξέων. Η αντοχή της στη θέρμανση, στο χαμηλό pH και στην πρωτεολυτική πέψη προέρχονται πιθανώς από τη συμπαγή τρισδιάστατη δομή της που περιέχει τουλάχιστον 3 συνδέσμους δισουλφιδίου (Chan και Giannella, 1981· Lazure et al., 1983). Ο μηχανισμός της δράσης του δεύτερου τύπου τοξίνης ST_B, που μπορεί να διακριθεί από την ST_A από την αδυναμία της να παράγει τη ρευστή έκκριση στο έντερο των θηλαζόντων νεογνών ποντικών, δεν είναι γνωστός αλλά δεν φαίνεται να λειτουργεί μέσω της υποκίνησης παραγωγής κυκλικών νουκλεοτιδίων.

1.1.3.2. Εντεροδιεισδυτικά στελέχη *E. coli* (EIEC).

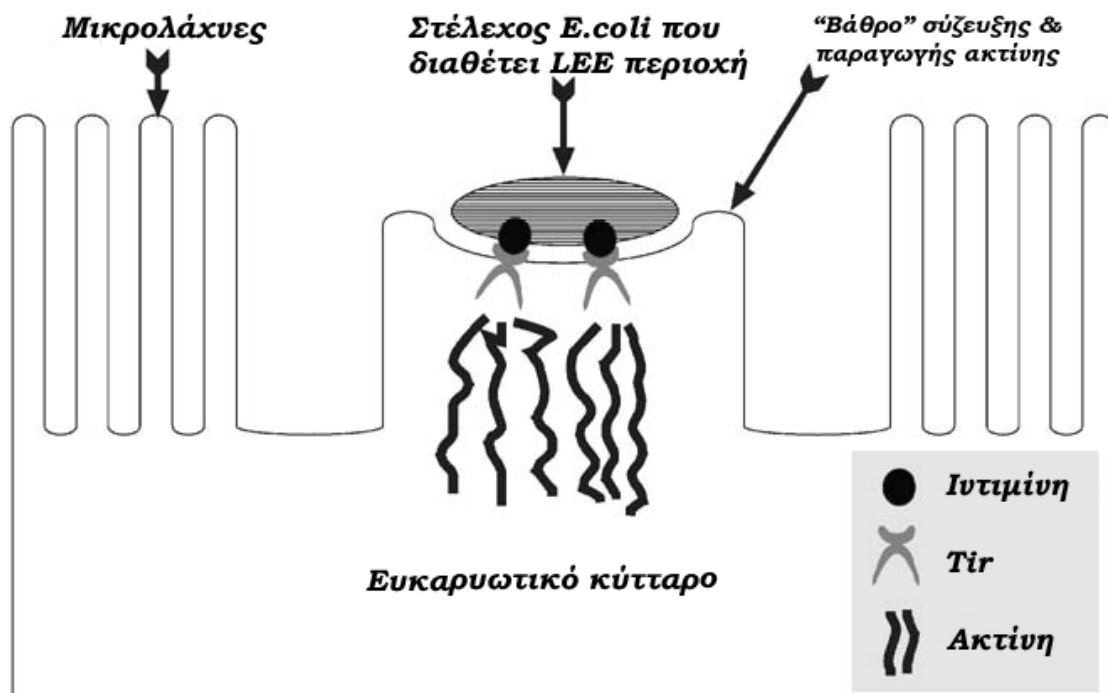
Η μόλυνση από EIEC οδηγεί στα κλασσικά συμπτώματα μιας βακτηριακής δυσεντερίας σαν αυτή που προκαλείται από τη *Shigella* (Day et al., 1981). Όπως η *Shigella*, έτσι και η EIEC εισβάλλει και πολλαπλασιάζεται μέσα στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (κόλον) προκαλώντας έλκος και φλεγμονή παρά το γεγονός ότι η EIEC δεν παράγει τοξίνη όπως η *Shigella* (Shiga toxin). Τα κλινικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα είναι πυρετός, δριμείς κοιλιακοί πόνοι, δυσφορία και συχνά μια

υδατώδης διάρροια που προηγείται της αποβολής αίματος, βλέννας και λευκοκυττάρων. Η εξάπλωση καθορίζεται από διάφορες πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης που κωδικοποιούνται από ένα μεγάλο πλασμίδιο (≈ 140 MDa). Η μολυσματική δόση EIEC εμφανίζεται να είναι ουσιαστικά υψηλότερη απ'ό,τι για τη *Shigella* και αυτό είναι πιθανότατα μια αντανάκλαση της μεγαλύτερης ευαισθησίας που παρουσιάζει ο μικροοργανισμός στη γαστρική οξύτητα.

1.1.3.3. Εντεροπαθογόνα στελέχη *E. coli* (EPEC).

Τα εντεροπαθογόνα στελέχη *E. coli* έχουν συνδεθεί με τη νηπιακή διάρροια, κυρίως στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Οι μολύνσεις από EPEC μεταδίδονται συχνά από άτομο σε άτομο. Τα συμπτώματα της μόλυνσης από EPEC, δηλαδή της δυσφορίας, του εμετού και της διάρροιας που περιέχει βλέννα και σπανιότερα αίμα, εμφανίζονται 12-36 ώρες μετά από την κατάποση του οργανισμού. Στα νήπια, η ασθένεια είναι πιο σοβαρή από πολλές άλλες διαρροϊκές μολύνσεις και μπορεί να διαρκέσει περισσότερο από δύο εβδομάδες σε μερικές περιπτώσεις. Η παθογένεια σχετίζεται με τη δυνατότητα των στελεχών EPEC να προσκολλώνται έντονα στη μεμβράνη των κυττάρων και να προκαλούν τραύματα. Αυτό είναι μια σύνθετη και συνάμα συναρπαστική διαδικασία που ρυθμίζεται από τα γονίδια που κωδικοποιούνται σε μια περιοχή 35 KB και η οποία ενοχοποιείται για την παθογένεια του μικροοργανισμού και αποκαλείται «γενετική περιοχή εξάλειψης των εντεροκυττάρων» (**Locus of Enterocyte Effacement - LEE**). Αυτή η περιοχή κωδικοποιεί το σύστημα έκκρισης τύπου III και τα εμπλεκόμενα χαπερόνια (chaperones) καθώς και πρωτεΐνες υπεύθυνες για την προσκόλληση στο έντερο. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας τα βακτήρια διευκολύνουν την προσκόλλησή τους με το να επιφέρουν μια σειρά αλλαγών στα εντεροκύτταρα (Donnenberg και Kaper, 1992· Donnenberg et al., 1997). Το προαναφερθέν βακτηριακό σύστημα έκκρισης τύπου III μεταφέρει μια άλλη πρωτεΐνη κωδικοποιημένη από την LEE γενετική περιοχή, την Tir, εντός του εντεροκυττάρου όπου και ενσωματώνεται στη μεμβράνη του. Εκεί ενεργεί ως δέκτης για μια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου, την ιντιμίνη, η οποία μεσολαβεί για τη στενή σύνδεση με το βακτηριακό κύτταρο και την μετέπειτα έναρξη παραγωγής ακτίνης (actin pedestals) ακριβώς κάτω από την περιοχή πρόσδεσης στο εντεροκύτταρο (Εικόνα 3). Το στάδιο σύνδεσης συνοδεύεται από αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων Ca^{+2} , την απελευθέρωση φωσφορικής ινσοιτόλης και την ενεργοποίηση της κινάσης της τυροσίνης, ένα ένζυμο που φωσφορυλιώνει

υπολείμματα τυροσίνης στις ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες. Μετά από αυτό τα εντεροκύτταρα διαμορφώνουν αδρές επιφάνειες στις οποίες τα βακτήρια βρίσκουν πρόσφορο έδαφος και προσκολλώνται με ακόμα μεγαλύτερη άνεση. Αυτό οδηγεί στην παραμόρφωση και την απώλεια μερικών μικρολαχνών γεγονός που θεωρείται ότι προκαλεί τη διάρροια αφού διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ της απορρόφησης και της έκκρισης στο λεπτό έντερο.



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση του τρόπου προσκόλλησης του βακτηρίου *E.coli* στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και δράσης της LEE γενετικής περιοχής που διαθέτει. (Joerg Jores et al., 2004)

1.1.3.4. Εντεροαιμορραγικά στελέχη *E. coli* (EHEC).

Η EHEC επίσης γνωστή και ως *E. coli* παράγουσα βεροτοξίνη (Verotoxin-producing *E. coli* – VTEC), περιγράφηκε αρχικά στον Καναδά όπου σε μερικές περιοχές συναγωνίζεται τα βακτήρια *Campylobacter* spp. και *Salmonella* spp. ως πιο συχνή αιτία διαρροϊκών συμπτωμάτων. Ο ορότυπος *E. coli* O157:H7 είναι ο πιο κοινά αναφερόμενος αν και εμφανίζονται και πολλοί άλλοι. Τα στελέχη EHEC έχουν τραβήξει την προσοχή όχι μόνο επειδή η τροφική μετάδοση είναι πιά κοινή απ'ότι με οποιοδήποτε άλλο στέλεχος *E. coli* που προκαλεί διαρροϊκά συμπτώματα, αλλά

επειδή η ασθένεια που προκαλεί μπορεί να κυμανθεί από μια μη-αιμορραγική διάρροια, μέσω της αιμορραγικής κολίτιδας, έως το απειλητικό για τη ζωή αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (Haemolytic Uraemic Syndrome-HUS) και τη θρομβωτική θρομβοκυτοπενική ερυθρίαση (Thrombotic Thrombocytopenic Purpura-TTP) (Karmali et al., 1983· Greated et al., 1994· Konowalchuk et al., 1977). Οι O'Brien και Holmes (1996) απέδειξαν ότι διαφορετικά στελέχη *E. coli* ήταν κυτταροτοξικά για τα κύτταρα HeLa και ότι αυτή η κυτταροτοξική επίδραση θα μπορούσε να εξουδετερωθεί από αντιτοξίνη που προετοιμάστηκε ενάντια στην τοξίνη **Shiga** προερχόμενη από τη *Shigella dysenteriae*. Αυτή την τοξίνη την αποκάλεσαν τοξίνη τύπου shiga (Shiga-like toxin-SLT). Αργότερα αποδείχθηκε ότι η βεροτοξίνη και η τοξίνη τύπου shiga ήταν στην πραγματικότητα η ίδια τοξίνη και ότι παρήχθη από στελέχη *E. coli* O157:H7 (Riley et al., 1983). Λίγο αργότερα προτάθηκε (Karmali et al., 1983) ότι η βεροκυτοτοξίνη και η τοξίνη τύπου Shiga ήταν οι παράγοντες αυτοί που προκαλούσαν εντεροκολίτιδα και HUS και ήταν υπεύθυνες για τη ζημία στους εντερικούς και νεφρικούς ιστούς.

Τα συμπτώματα της αιμορραγικής κολίτιδας υποχωρούν από μόνα τους με την πάροδο του χρόνου αφού αρχικά προκαλέσουν μια οξεία, αιμορραγική διάρροια που διαρκεί 4-10 ημέρες. Τα συμπτώματα αρχίζουν με στομαχικές κράμπες και υδατώδη διάρροια 1-2 (μερικές φορές 3-8) ημέρες μετά από την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων και στις περισσότερες περιπτώσεις, κατά τη διάρκεια των επόμενων 1-2 ημερών εξελίσσονται σε μια αιματηρή διάρροια με δριμύ κοιλιακό πόνο. Διακρίνεται από την τυπική κολίτιδα από την έλλειψη πυρετού και την απουσία λευκοκυττάρων στον εμετό. Έχει επιπτώσεις κυρίως στους ενηλίκους, με μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης κατά τους θερινούς μήνες, και μπορεί να είναι απειλητική για τη ζωή των ηλικιωμένων. Το HUS διαθέτει τρία χαρακτηριστικά γνωρίσματα, την **οξεία νεφρική ανεπάρκεια**, την **αιμολυτική αναιμία** (μείωση του αριθμού ερυθρών αιμοσφαιρίων) και τη **θρομβοκυτοπενία** (μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων του αίματος), που προηγείται μερικές φορές της αιματηρής διάρροιας. Εμφανίζεται πολύ συχνά στα παιδιά όπου είναι η κύρια αιτία της οξείας νεφρικής ανεπάρκειας στη δυτική Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική. Περίπου 10% των παιδιών κάτω από 10 ετών που μολύνθηκαν με *E. coli* O157 τείνει να εμφανίσει HUS και το 50% εξ αυτών θα χρειαστεί αιμοκάθαρση ενώ το ποσοστό θνησιμότητας ανέρχεται γενικά στο 3-5%. Σε 70 περιπτώσεις κρουσμάτων στο Λονδίνο μεταξύ 1980 και 1986 το ποσοστό μοιραίων περιστατικών ήταν 6-13% από άτομα που εμφάνιζαν μακροχρόνια νεφρική

βλάβη. Σ'έναν οίκο ευγηρίας στη βορειο αμερική, το ποσοστό θνητότητας εκ συνόλου 55 ασθενών ήταν 31%.

Η θρομβωτική θρομβοκυτοπενική ερυθρίαση είναι μια λιγότερο κοινή επιπλοκή που είναι κατά ένα μεγάλο μέρος περιορισμένη στους ενηλίκους. Συσχετίζεται με το HUS αλλά προκαλεί μικρότερη βλάβη στους νεφρούς και περιλαμβάνει πυρετό και νευρολογικά συμπτώματα ως αποτέλεσμα των θρόμβων αίματος στον εγκέφαλο. Η σύνδεση στα κύτταρα είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην ικανότητα πρόκλησης συμπτωμάτων και το στελέχος O157:H7 διαθέτει την περιοχή παθογένειας LEE (βλέπε ανωτέρω 1.1.3.3.) και προσκολλώνται με ένα μηχανισμό όμοιο αυτού των στελεχών EPEC, που χαρακτηρίζεται από την σύνδεση των βακτηριακών κυττάρων στα επιθηλιακά κύτταρα και την αποβολή μικρολαχνών. Τα γονίδια που κωδικοποιούν την ιντιμίνη, τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες EspA και EspB, και το μεταβολικό μονοπάτι έκκρισης τύπου III εντοπίζονται πάνω στην LEE περιοχή (Jarvis and Kaper, 1996).

Τα στελέχη της EHEC παράγουν τη βεροτοξίνη ή Verotoxin (αποκαλούμενη έτσι λόγω της ικανότητάς της να καταστρέφει τα νεφρικά κύτταρα του αφρικανικού πράσινου πιθήκου Vero). Οι μελέτες έχουν αποκαλύψει την παρουσία τουλάχιστον δύο τοξινών των VT I και VT II που λόγω της ομοιότητάς τους στην τοξίνη Shiga έχουν ονομαστεί επίσης τοξίνες τύπου shiga, SLTI και SLTII. Έχει προταθεί να οργανωθεί ορθολογικά η ονοματολογία για αυτές τις τοξίνες ως μέλη της «οικογένειας» των τοξινών Shiga, έτσι ώστε αυτή καθ'έαυτή η τοξίνη Shiga να λάβει την κωδική ονομασία Stx, και οι τοξίνες SLTI και II να ονομαστούν Stx 1 και Stx 2 αντίστοιχα. Το Stx 1 φέρει μεγαλύτερη ομοιότητα προς την τοξίνη Shiga αφού αποτελείται επίσης από τις A (μοριακό βάρος 32 kDa) και B (μοριακό βάρος 7.7 kDa) υποομάδες και οι ομάδες B είναι δομικά ίδιες μεταξύ των δύο τοξινών. Οι ομάδες B προσκολλώνται στο δέκτη γλυκολιπιδίων Gb₃, στην επιφάνεια ευκαρυωτικών κυττάρων και η αυξημένη ευαισθησία του νεφρού στις μολύνσεις από τα στελέχη O157 μπορεί να οφείλεται στο μεγαλύτερο αριθμό αυτών των δεκτών στα νεφρικά σπειράματα (kidney glomeruli). Μετά από τη σύνδεση, η τοξίνη εισέρχεται εντός του κυττάρου με ενδοκύτωση και την υποομάδα A ενεργοποιημένη. Υδρολύει στη συνέχεια τον N-γλυκοσιδικό δεσμό μιας συγκεκριμένης αδενοσίνης στο 28S rRNA με αποτέλεσμα την παύση της πρωτεϊνικής σύνθεσης στο κύτταρο. Η τοξίνη Stx 2 επίσης περιλαμβάνει δύο υποομάδες A και B αλλά αυτές είναι μεγαλύτερες απ'ό,τι στην Stx 1 (μοριακό βάρος 35 kDa και 10.7 kDa αντίστοιχα για τις A και B).

Παρολ' αυτά διαθέτουν μια ομοιότητα 60% στην ακολουθία των αμινοξέων, με την τοξίνη Shiga. Ενώ η Stx 1 είναι μια ιδιαίτερα συντηρητική τοξίνη, η Stx 2 εμφανίζει παραλλαγές όπως είναι οι Stx2c, Stx2v, Stx2hb, και Stx2e. Ένα στέλεχος EHEC μπορεί να εκφράσει την Stx 1 μόνο, την Stx 2 μόνο, και τις δύο μαζί ή ακόμα και κάποιες από τις παραλλαγές της Stx 2.

1.1.3.5. Εντεροαθροιστικά στελέχη *E. coli* (EAEC)

Η κατηγορία αυτή περιγράφηκε πρόσφατα σαν ξεχωριστή και το όνομά της προκύπτει από τον χαρακτηριστικό τρόπο προσκόλλησης των κολοβακτηριδίων αυτών στα κύτταρα της ιστοκαλλιέργειας Hep-2 in vitro. Σε αντίθεση με τα EPEC στελέχη τα οποία προσκολλώνται κατά τόπους και λιγότερο συχνά διάχυτα στα κύτταρα της ιστοκαλλιέργειας, τα EAEC σχηματίζουν αθροίσματα σαν «σωρούς πλίνθων», που προσκολλώνται τόσο πάνω στα κύτταρα, όσο και στα μεταξύ τους κενά (Nataro 1987). Η παθογένεια των EAEC δεν έχει γίνει απολύτως κατανοητή παρά τις ιστοπαθολογικές αλλαγές που επιφέρει στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου των ασθενών και των πειραματόζωων (Tzipori et al., 1992· Hicks et al., 1996). Όλες αυτές οι παρατηρήσεις έδειξαν ότι μερικές από τις αλλαγές που προκλήθηκαν κατά τη διάρκεια της μόλυνσης συνδέθηκαν με την παραγωγή μιας κυτταροτοξίνης. Με βάση αυτή την κυτταροτοξίνη προσδιορίστηκαν δύο πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους (Eslava et al., 1993), οι οποίες, όταν εισήχθησαν σε αρουραίους μέσω του κυκλοφορικού συστήματος, προκάλεσαν σμίκρυνση των λαχνών, αιμορραγικές και νεκρωτικές αλλαγές καθώς και έλκος του ανώτερου επιθηλίου. Μια από αυτές τις πρωτεΐνες, η **Pet** (plasmid-encoded toxin), κωδικοποιείται από το πλασμίδιο **pAA** μοριακού βάρους 65 Mda (Nataro et al., 1998b) και πρόσφατα αποδείχθηκε ότι προκαλούν φαινόμενα αποσταθεροποίησης των κυττάρων HEp-2 και HT29 C1 στις αντίστοιχες καλλιέργειες λόγω στρογγυλοποίησης και συστολής του κυτταροσκελετού με αποτέλεσμα την μη δυνατότητα παραμονής τους στον ιστό (Navarro-Garcia et al., 1999) και πρόκλησης διαταραχών στο δίκτυο πρωτεϊνών του σκελετού της κυτταρικής μεμβράνης (Villaseca et al., 2000). Η **Pic** (protein of intestinal colonization) είναι η δεύτερη πρωτεΐνη (τοξίνη) υψηλού μοριακού βάρους που εντοπίζεται στα στελέχη EAEC. Η Pic κωδικοποιείται στα χρωμοσώματα των στελεχών EAEC και *Shigella flexneri* και είναι μια πρωτεΐνη 110 kDa που εκκρίνεται στο υπερκείμενο των καλλιιεργειών, της οποίας η ακολουθία αμινοξέων παρουσιάζει ομοιότητα με τους μεταφορείς

πρωτεασών σερίνης της οικογένειας *Enterobacteriaceae*. Οι προσδιορισμένες ιδιότητες της Pic περιλαμβάνουν τη δραστηριότητα της πρωτεάσης μουκινάση, την αντίσταση στον ορό (serum resistance) και την πήξη των ερυθρών αιμοσφαιρίων (hemagglutination), χαρακτηριστικά που δείχνουν ότι η τοξίνη Pic είναι μια πολυσύνθετη πρωτεΐνη που συμμετέχει στην εντερική παθογένεια (Henderson et al., 1999).

1.1.4. Συσχετισμός με τα τρόφιμα

Η κοπρανώδης μόλυνση των παροχών νερού καθώς και η επιμόλυνση που προκύπτει από μη ορθή βιομηχανική πρακτική ή χειρισμό τροφίμων είναι κάποιες από τις κύριες αιτίες που κατά καιρούς έχουν οδηγήσει σε ξεσπάσματα μαζικών τροφοδηλητηριάσεων που προκαλούνται από στελέχη EPEC, EIEC και ETEC. Μια πληθώρα τροφίμων έχουν εμπλακεί σε τέτοιου είδους περιστατικά συμπεριλαμβανομένου ενός υποκατάστατου καφέ στη Ρουμανία το 1961, διαφόρων λαχανικών, πουρέ πατάτας αλλά και σούσι. Στις Ηνωμένες Πολιτείες κάποια μαλακά τυριά είναι αρμόδια για τις τροφοδηλητηριάσεις του 1971 που συνδέθηκαν με EIEC κατά τις οποίες περισσότεροι από 387 άνθρωποι νόσησαν καθώς και το 1983 με εμπλοκή στελέχους ETEC (με ανθεκτική στη θέρμανση τοξίνη). Ο μικροοργανισμός *E. coli* δεν αναμενόταν να επιβιώσει με ευκολία σε ένα ζυμούμενο γαλακτοκομικό προϊόν με pH κάτω από 5 αλλά η τοπική αύξηση του pH λόγω της διαδικασίας της ωρίμανσης διαμέσου χρήσης από τους μύκητες του γαλακτικού οξέος, έχει ως συνέπεια την παραγωγή αμινών και δημιουργία κατάλληλων συνθηκών για ανάπτυξη του βακτηρίου. Τα περιστατικά που προκαλούνται από EHEC με ορότυπο O157:H7 περιλαμβάνουν κυρίως τα ελλιπώς ψημένα προϊόντα από κιμά και περιστασιακά το απαστερίωτο γάλα. Τα βοοειδή φαίνονται να είναι μια σημαντική πηγή μόλυνσης και το στέλεχος O157:H7 έχει απομονωθεί από ποσοστό 0.9 - 8.2% των υγιών βοοειδών στο Ηνωμένο Βασίλειο. Άλλες έρευνες έχουν απομονώσει το συγκεκριμένο ορότυπο από το 3.7% των δειγμάτων (6/164 δείγματα) του φρέσκου βόειου κρέατος του λιανικού εμπορίου και από ένα σημαντικό ποσοστό (1-2%) άλλων προϊόντων φρέσκου κρέατος όπως το χοιρινό κρέας, τα πουλερικά και το αρνί. Έχουν υπάρξει κάποια πολύ μεγάλοι εύρους περιστατικά ανά τον κόσμο και ο δημόσιος αντίκτυπός τους ήταν συχνά δραματικός. Εξακόσιοι άνθρωποι νόσησαν και τέσσερα παιδιά πέθαναν σε μια επιδημική έκρηξη στις Ηνωμένες Πολιτείες το 1993 που προκλήθηκε από τα ελλιπώς ψημένα χάμπουργκερ βόειου κρέατος. Αυτό προκάλεσε μια

σημαντική δημόσια επίκριση για την υγιεινή του κρέατος και οδήγησε, μεταξύ άλλων, στην εισαγωγή νέων κανονισμών σήμανσης του κρέατος. Τον Αύγουστο του 1997, μια σωρεία περιπτώσεων στο Κολοράντο οδήγησε στη μεγαλύτερη ανάκληση τροφίμων στην αμερικανική ιστορία όταν ανακλήθηκαν περισσότεροι από 12.000 τόνοι βόειου κιμά. Ένα μεγάλο ξέσπασμα στη Σκωτία το 1996 άσκησε παρόμοια επίδραση στο Ηνωμένο Βασίλειο. Σχεδόν 500 άτομα νόσησαν και 20 ηλικιωμένοι ασθενείς απεβίωσαν. Η αιτία ήταν πιθανότατα διασταυρούμενη επιμόλυνση (cross-contamination) έτοιμων προς κατανάλωση μαγειρευμένων κρεάτων από ακατέργαστο κρέας σε ένα κρεοπωλείο και η επακόλουθη έρευνα οδήγησε σε πιο αυστηρούς κανονισμούς.

Οι αποτυχίες που οδήγησαν σε αυτές τις επιδημικές εξάρσεις ήταν παραλείψεις των βασικών κανόνων υγιεινής στα τρόφιμα. Στην περίπτωση του απαστερίωτου γάλακτος και των προϊόντων από βόειο κρέας η πρωταρχική αιτία είναι μια αποτυχία στο να υποστεί το τελικό προϊόν επαρκή θερμική επεξεργασία/ψήσιμο. Από την άλλη είναι αλήθεια ότι ολόκληρα τεμάχια κρέατος όπως οι μπριζόλες μπορούν συχνά να καταναλωθούν ακίνδυνα ακόμα και όταν το εσωτερικό δεν είναι επαρκώς ψημένο αφού η μικροβιακή μόλυνση είναι συνήθως ένα φαινόμενο επιφάνειας. Ο τεμαχισμός του κρέατος, εντούτοις, θα διασπείρει τους μολυσματικούς παράγοντες επιφάνειας σε όλη τη μάζα των προϊόντων και επομένως θα χρειαστούν τη διείδυση της θερμότητας προκειμένου να εξασφαλιστεί μικροβιακή ασφάλεια. Εδώ να σημειωθεί ότι το Υπουργείο Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (USDA) έχει εκπονήσει κανονισμούς που διευκρινίζουν ότι το κέντρο των χάμπουργκερ βόειου κρέατος πρέπει να φθάσει στο ψήσιμο τους 71.1°C (160°F) στιγμιαία στην περίπτωση των καταναλωτών και τους 68.3°C (155°F) για 16 δευτερόλεπτα στις περιπτώσεις μαζικής εστίασης (catering). Περιστατικά κρουσμάτων με EHEC έχουν αναφερθεί και με άλλα τρόφιμα. Το μαρούλι έχει εμπλακεί κι αυτό σε διάφορες περιπτώσεις όπως επίσης και ο απαστερίωτος χυμός μήλων ο οποίος ήταν ο «υπαίτιος» σε ένα μεγάλο ξέσπασμα τροφοδηλητηρίασης στις ΗΠΑ. Το καλοκαίρι του 1996, σε μια επιδημία στην Ιαπωνία πάνω από 9000 άτομα νόσησαν και 12 παιδιά πέθαναν. Η μεγαλύτερη έξαρση κατά τη διάρκεια της επιδημίας, στην πόλη Sakai περιελάμβανε 5700 ανθρώπους και ήταν συνέπεια μολυσμένων βλαστών ραδικιών και το ίδιο προϊόν ενεπλάκη σε νέα κρούσματα το επόμενο έτος. Τα περιστατικά που προκαλούνται από όξινα τρόφιμα όπως ο χυμός μήλων αλλά και τα ζυμούμενα λουκάνικα μας υπενθυμίζουν την ικανότητα των βακτηρίων να επιζήσουν για

παρατεταμένες περιόδους στις χαμηλές τιμές pH που δεν επιτρέπουν την αύξηση, ειδικά όταν το προϊόν καταψύχεται. Στελέχη EHEC εμφανίζεται να έχουν μια χαρακτηριστική ικανότητα να επιζούν σε χαμηλές τιμές pH από άλλα βακτήρια και αυτό μπορεί επίσης να δικαιολογήσει και τη σχετικά χαμηλή μολυσματική δόση που έχει καταγραφεί σε διάφορα κρούσματα και κυμαίνεται από 2 έως 2000 κύτταρα.

1.2. Επιβίωση του μικροοργανισμού *E. coli* υπό συνθήκες όξινης καταπόνησης

1.2.1. Μηχανισμοί αντίδρασης στην περιβαλλοντική αλλαγή

Πρώτη προτεραιότητα των μικροοργανισμών – και τα εντεροβακτήρια δεν αποτελούν εξαίρεση του κανόνα – είναι η επιβίωση και δευτερευόντως η ανάπτυξη και εξέλιξη σε ένα δοθέν περιβάλλον, μεταβαλλόμενο ή μη. Έτσι καλούνται να υπερνικήσουν τις περιβαλλοντικές προκλήσεις που περιλαμβάνουν μια πληθώρα εμποδίων όπως είναι η όξινη ή αλκαλική καταπόνηση, η επίδραση υψηλών τιμών θερμοκρασίας ή/και υδροστατικής πίεσης, η επίδραση μεταλλικών ιόντων, η επίδραση λιπαρών οξέων μικρού μήκους αλειφατικής αλυσίδας όπως επίσης καλούνται να αντισταθούν και στην ύπαρξη τυχόν αντιβιοτικών στο περιβάλλον ανάπτυξης. Πολύ συχνά αυτή η προσπάθεια λαμβάνει τη μορφή **προγραμματισμένων αντιδράσεων** (programmed responses) στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα ενώ άλλες φορές περιλαμβάνει τον «προγραμματισμό» ορισμένων γονιδίων τα οποία θα υποβληθούν εσκεμμένα σε μεταλλάξεις και μέσω αυτού του μηχανισμού παράγονται φαινότυποι που οδηγούν σε μικτούς πληθυσμούς άρα κατά συνέπεια σε μεγαλύτερη παραλλακτικότητα και ικανότητα επιβίωσης. Η διαδικασία αυτή «προγραμματισμού» αναφέρεται ως **παραλλαγή φάσης** (phase variation) και περιλαμβάνει προβλέψιμες και προκαθορισμένες αλλαγές στη δομή του βακτηριακού DNA που μεσολαβεί της έκφρασης των φαινοτύπων για αντιστροφή μιας κατάστασης (περιβαλλοντικής πρόκλησης) και δημιουργίας προσαρμοστικού πλεονεκτήματος στα διάφορα περιβάλλοντα (Salaun et al., 2003). Στις περίπτωση των προγραμματισμένων αντιδράσεων μια μεταβολή στο περιβάλλον ανιχνεύεται, μεταδίδεται και οδηγεί στην αλλαγή έκφρασης των γονιδίων. Η αλλαγή στο περιβάλλον επομένως προηγείται της επιφερόμενης αλλαγής στο μικροοργανισμό και ολόκληρος ο πληθυσμός μπορεί ενδεχομένως να ανταποκριθεί στις νέες συνθήκες. Στην παραλλαγή φάσης όμως το σύστημα είναι πιο δυναμικό αφού οι νέοι φαινότυποι παράγονται συνεχώς. Όταν

προκύπτει κάποιος φαινότυπος που έχει πλεονεκτήματα στην προσαρμοστικότητα θα επεκταθεί και θα καταλαμβάνει όλο και μεγαλύτερο ποσοστό του πληθυσμού μέσω της κλωνικής εξέλιξης και της αναπόφευκτης αντικατάστασης. Επομένως η αλλαγή στο μικροοργανισμό προηγείται της αλλαγής στις συνθήκες του περιβάλλοντος και δεν έχει επιπτώσεις σε ολόκληρο τον πληθυσμό. Αυτό πολύ απλά σημαίνει ότι οι οργανισμοί που χρησιμοποιούν την παραλλαγή φάσης για να προσαρμοστούν στο μεταβαλλόμενο περιβάλλον υποβάλλονται ενδεχομένως σε πολύ περισσότερες «κλωνικές μεταβάσεις». Οι μικροοργανισμοί *E. coli* και *Salmonella* spp. για να αποφύγουν ακριβώς αυτή την συχνή κλωνική αντικατάσταση έχουν αναπτύξει ανασυνδυασμένους μηχανισμούς αντιστροφής που μεσολαβούν στη ρύθμιση των γονιδίων, ενώ παράλληλα διατηρούν σχετικά λίγες, εν δυνάμει ασταθείς απλές επαναλαμβανόμενες ακολουθίες, στα γονιδιώματά τους.

Πέραν όμως των ενδοκυτταρικών αλλαγών που επιφέρονται προκειμένου ο μικροοργανισμός να προσαρμοστεί στο νέο περιβάλλον έχει καθιερωθεί η άποψη ότι η επαγωγή της ανθεκτικότητας σε δυσμενές περιβάλλον εξαρτάται από την παρουσία **εξωκυτταρικών αισθητήριων στοιχείων** (Extracellular Sensing Components-ESC) τα οποία με τη σειρά τους μετατρέπονται - κατόπιν επίδρασης όξινων συνθηκών - σε **εξωκυτταρικά στοιχεία επαγωγής** (Extracellular Induction Component-EIC) χωρίς να είναι απαραίτητο να είναι παρόντες οι μικροοργανισμοί. Στην περίπτωση της επαγωγής της ανθεκτικότητας της *E. coli* σε όξινες συνθήκες αφενός η αφαίρεση των εξωκυτταρικών στοιχείων ESC και EIC ή η καταστροφή τους κατά τη διάρκεια της επώασης σταματά την επαγωγή (Rowbury και Goodson, 1998b· Rowbury, 1999a) και αφετέρου η παρουσία μορίων όπως η cAMP and το HCO_3^- την παρεμποδίζουν αφού δημιουργούν εξωκυτταρικά σύμπλοκα που παρεμποδίζουν τη λειτουργία των επαγωγέων EIC. Τα EIC που παράγονται σε pH 5.0 δικαιολογούν τον ορισμό των Bochner et al. (1984) περί **αλαρμονών** (alarmone) αλλά υπερτερούν στο ότι είναι εξωκυτταρικά και εν διαλύσει στοιχεία και μπορούν κατ'αυτό τον τρόπο να «προειδοποιήσουν» άλλους μικροοργανισμούς και να τους προετοιμάσουν να αντισταθούν στο όξινο περιβάλλον. Θα μπορούσαν δηλαδή τα μόρια αυτά να ενεργήσουν και ως πληροφοριοδότες μεταξύ των κυττάρων και ως αλαρμόνες που θα διασκορπίζονταν στο περιβάλλον ανάπτυξης και θα προετοιμάζαν τα μη προσαρμοσμένα κύτταρα να αντισταθούν στην επερχόμενη αύξηση του pH. Διάφοροι μεταβολίτες όπως η γλυκόζη, το ασπαρτικό οξύ, το L-γλουταμινικό οξύ, ο τριχλωριούχος σίδηρος (FeCl_3) και η L-προλίνη επάγουν την ανθεκτικότητα σε όξινο

περιβάλλον σε pH 7.0 (Rowbury και Goodson, 1997) και μια τέτοια επαγωγή απαιτεί την ύπαρξη ενός στοιχείου EIC (Rowbury, 1999a). Σε κάθε περίπτωση που έχει μελετηθεί έως τώρα, ο μεταβολίτης αλληλεπιδρά με έναν εξωκυτταρικό αισθητήρα ESC για να δώσει ένα στοιχείο επαγωγής της ανθεκτικότητας EIC (Rowbury και Goodson, 1999b).

1.2.2. Συστήματα ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση

Από όλους τους προταθέντες έως τώρα μηχανισμούς επαγωγής της ανθεκτικότητας σε όξινες συνθήκες προκειμένου για το εντεροβακτήριο *E. coli* ένας θεωρείται ο πιο αποδεκτός. Βάσει αυτού λοιπόν υπάρχουν τρία συστήματα που παρέχουν διαφορετικά επίπεδα προστασίας με διαφορετικές απαιτήσεις και επαγωγικές συνθήκες (Shi και Bennett, 1994· Lin et al., 1995, 1996· Stim-Herndon et al., 1996· Castanie-Cornet et al., 1999· Tramonti et al., 2002). Το χαρακτηριστικό που παραμένει κοινό και στα τρία συστήματα είναι ότι κάθε ένα από αυτά προστατεύει τα κύτταρα που βρίσκονται στην στατική φάση από την όξινη καταπόνηση παρά το ότι μπορεί να βρίσκονται υπό διαφορετικές συνθήκες. Επιπλέον έχουν περιγραφεί και άλλα λιγότερο αποτελεσματικά συστήματα ανθεκτικότητας για το μικροοργανισμό *E. coli* (Goodson and Rowbury, 1989a) ενώ έρευνες για την εκθετική φάση ανάπτυξης και την παρεχόμενη ανθεκτικότητα δεν κατέληξαν σε σημαντικά αποτελέσματα γύρω από τους μηχανισμούς δράσης (Foster and Hall, 1991· Linet al., 1995). Το απαύγασμα όμως όλων αυτών των ερευνών είναι ότι τα τρία αυτά συστήματα προσφέρουν ανθεκτικότητα σε ένα εύρος pH από 4 έως 1.5.

1.2.2.1. Σύστημα οξεοανθεκτικότητας 1 (Acid Resistance system 1 - AR1)

Η ενεργοποίηση αυτού του συστήματος γίνεται όταν το βακτήριο *E. coli* αναπτύσσεται σε ήπια όξινα (pH 5.5) θρεπτικά υποστρώματα απουσία γλυκόζης. Κατά συνέπεια η δράση του συστήματος AR1 επάγεται σε όξινο περιβάλλον και κύτταρα τα οποία θα καλλιεργηθούν υπ'αυτές τις συνθήκες ανθίστανται σε όξινη καταπόνηση με pH κοντά στο 2.5 παρουσία ελαχίστων ποσοτήτων γλυκόζης (Castanie-Cornet et al., 1999). Οι κύριοι ρυθμιστές αυτού του συστήματος περιλαμβάνουν τον παράγοντα σ^S , την κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP) και την πρωτεΐνη-δέκτη της cAMP CRP. Μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε από αυτά τα γονίδια εμποδίζουν τη δράση του συστήματος AR1 (Castanie-Cornet et al., 1999). Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω η ανθεκτικότητα που παρέχει το AR1 διαφέρει από των

AR2 και AR3 από διάφορες απόψεις. Μια διαφορά είναι ότι, αντίθετα από τα AR2 και AR3, τα δομικά συστατικά του AR1 δεν έχουν προσδιοριστεί. Αν και το AR1 παρέχει το μικρότερο επίπεδο προστασίας από τα τρία επαγόμενα συστήματα στη στατική φάση έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα βασικό στοιχείο στην ικανότητα επιβίωσης του μικροοργανισμού *E.coli* κατά τη διάρκεια της όξινης καταπόνησης με τιμές pH άνω του 3 (Audia et al., 2001).

Πρόσφατα στοιχεία που συνδέουν την **F₀/F₁ ΑΤΡαση** μεταφοράς πρωτονίων με το AR1 δείχνουν ότι αυτή θα μπορούσε να ενεργήσει ως αντλία πρωτονίων κατά τη διάρκεια της όξινης καταπόνησης που εξωθεί τα πρωτόνια εκτός του κυττάρου με συνακόλουθη υδρόλυση του ATP. Αν και ανεπαρκής διαδικασία, μια άντληση πρωτονίων θα μπορούσε να βοηθήσει προς την κατεύθυνση διατήρησης ενός ενδοκυτταρικού pH σταθερού στις ακραίες όξινες συνθήκες. Επίσης διαφορές στην περιεκτικότητα της μεμβράνης σε κυκλοπροπανικό οξύ (cyclopropane fatty acid-CFA), που εξαρτάται κι αυτό από τον παράγοντα RpoS – όπως και το σύστημα AR1 – (Wang και Cronan, 1994· Castanie-Cornet et al., 1999) μπορεί να είναι ένας σημαντικός παράγοντας στη μείωση της διαπερατότητας της μεμβράνης από τα πρωτόνια κατά τη διάρκεια της όξινης καταπόνησης. Η μετατροπή των ακόρεστων λιπαρών οξέων (unsaturated fatty acids-UFA) σε CFA από τη συνθετάση του CFA μπορεί να μειώσει τη διαπερατότητα της μεμβράνης στα πρωτόνια με αποτέλεσμα αύξηση της ανθεκτικότητας.

Ένα άλλο φαινομενικά απαραίτητο συστατικό του AR1 είναι το **HdeA** το οποίο είναι μέρος του παράγοντα σίγμα, RpoS, που επάγεται από την παρουσία λιπαρών οξέων μικρού μήκους (Arnold et al., 2001· Kirkpatrick et al., 2001). Δεδομένου ότι ο παράγων RpoS είναι ένα ουσιαστικό στοιχείο του συστήματος AR1 (Castanie-Cornet et al., 1999) και μετάλλαξη του γονιδίου hdeA που κωδικοποιεί τη σύνθεση του HdeA (Gajiwala και Burley, 2000), έχει ως αποτέλεσμα υπερευαισθησία του βακτηρίου *E. coli* σε συνθήκες ακραία όξινης καταπόνησης (Gajiwala και Burley, 2000), είναι πολύ πιθανό ότι και το HdeA είναι ένα σημαντικό στοιχείο του συστήματος AR1.

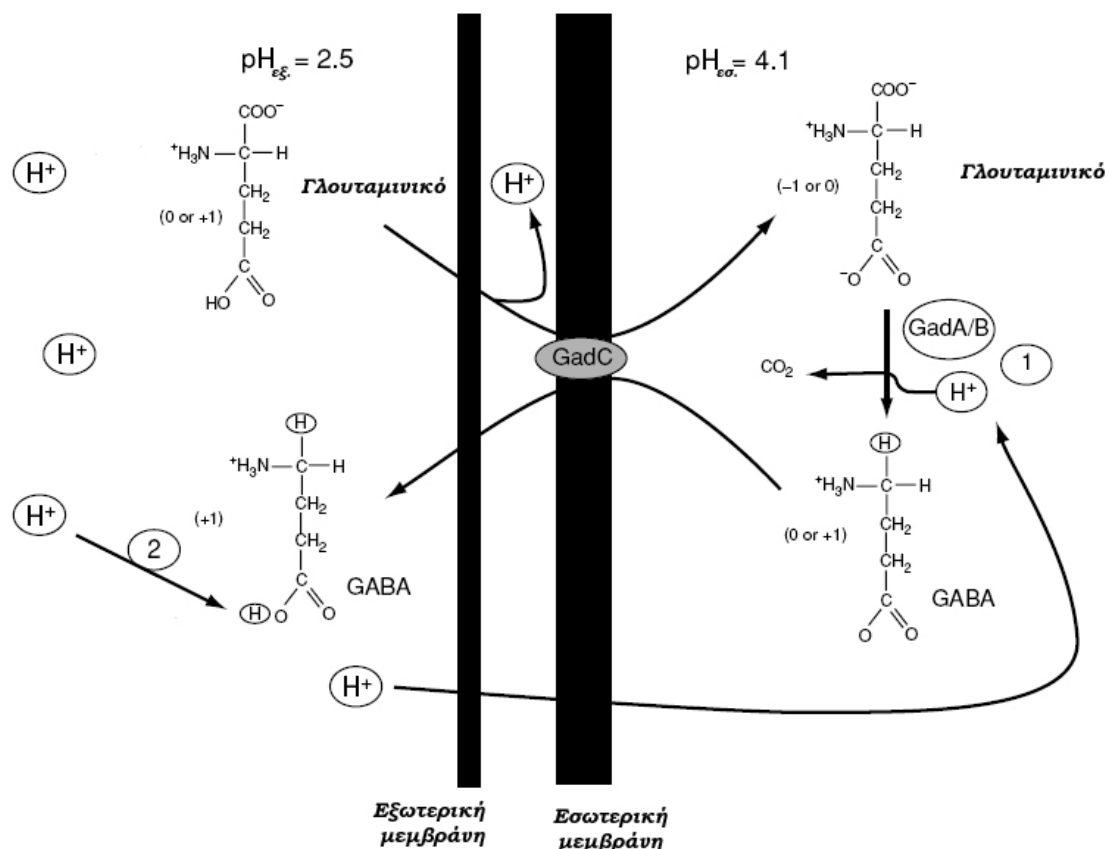
1.2.2.2. Σύστημα οξεοανθεκτικότητας 2 (Acid Resistance system 2 – AR2)

Από όλα τα συστήματα οξεοανθεκτικότητας, το σύστημα 2 έχει μελετηθεί εκτενέστερα. Το AR2 είναι ένα σύστημα εξαρτώμενο από το γλουταμινικό οξύ (glutamate) και η ενεργοποίηση του συστήματος εμφανίζεται όταν τα κύτταρα του

μικροοργανισμού καλλιεργούνται σε σύνθετα μέσα ανάπτυξης που περιέχουν γλυκόζη. Τα δομικά στοιχεία αυτού του συστήματος περιλαμβάνουν τα ισοένζυμα **GadA** (που κωδικοποιείται από το γονίδιο **gadA**) και **GadB** (που κωδικοποιείται από το γονίδιο **gadB**) της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού οξέος και τον αντιμεταφορέα **GABA** που κωδικοποιείται από το γονίδιο **gadC** (Hersh et al., 1996). Σε αυτό το σημείο να επισημανθεί ότι υπάρχουν τουλάχιστον δύο ρυθμιστικά κυκλώματα που ελέγχουν τα **gadA/BC**. Το ένα περιλαμβάνει το γονίδιο **yhiE**, που είναι ουσιαστικά απαραίτητο για την έκφραση των **gadA/BC** υπό οποιαδήποτε συνθήκη. Ένα δεύτερο σύστημα που καλύπτει τα **cAMP**, **CRP**, **RpoS**, και **GadX** (**YhiX**) διατηρεί τον έλεγχο στα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά (π.χ. γλυκόζη) μέσα ανάπτυξης. Οι δύο αποκαρβοξυλάσες του γλουταμινικού που κωδικοποιούνται από τα **gadA** και **gadB** είναι ισοένζυμα με άριστο pH δράσης 3.8 (Boeker και Snell, 1972· Smith et al., 1992) και καταλύουν τη μετατροπή του γλουταμινικού σε γ-αμινοβουτυρικό οξύ (**GABA**) με πρόσληψη ενός πρωτονίου και απελευθέρωση ενός μορίου CO_2 . Μεταλλάξεις στον αντιμεταφορέα **GABA** (γονίδιο **gadC**) ή στις αποκαρβοξυλάσες του γλουταμινικού (διπλή μετάλλαξη στα **gadA** και **gadB**) παρεμποδίζουν το μηχανισμό ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση χωρίς όμως να συμβάινει το ίδιο αν συμβεί μετάλλαξη στα γονίδια μιας εκ των δύο αποκαρβοξυλασών (**gadA** και **gadB**) (Castanie-Cornet et al., 1999).

Υπάρχουν διάφορες υποθέσεις που περιγράφουν το σύστημα ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση, **AR2**, με πιο επικρατές αυτό κατά το οποίο η κατανάλωση ενδοκυτταρικών πρωτονίων κατά τη διάρκεια της αποκαρβοξυλίωσης διατηρεί το εσωτερικό pH σε επίπεδα τέτοια που συμβάλλουν στην επιβίωση του μικροοργανισμού *E. coli* (Foster, 2001) (Εικόνα 4). Συγκεκριμένα σε περιβάλλον όξινου pH (2.5) πρωτόνια κινούνται εντός του κυττάρου και αυξάνουν την κυτταροπλασματική οξύτητα. Όταν συμβεί αυτό γλουταμινικό οξύ μεταφέρεται από τον αντιμεταφορέα **GadC**, αποκαρβοξυλιώνεται από το ζεύγος αποκαρβοξυλασών **GadA/B** προς γ-αμινοβουτυρικό οξύ (**GABA**), με την κατανάλωση όπως προαναφέρθηκε ενός πρωτονίου και την απελευθέρωση CO_2 . Το **GABA** μεταφέρεται έπειτα εκτός του κυττάρου με τη συνακόλουθη πρόσληψη γλουταμινικού. Πιθανότατα τα πρωτόνια που βρίσκονται στην καρβοξυλομάδα του γλουταμινικού θα απελευθερωθούν στο περίπλασμα πριν μεταφερθούν εντός του κυττάρου από το μεταφορέα **GadC** ή κατά τη διάρκεια του περάσματος τους μέσω του καναλιού. Αντίστοιχα υπάρχουν δύο πιθανά σημεία όπου τα πρωτόνια μπορούν να

«καταναλωθούν» (Εικόνα 4): στο σημείο 1 εντός του κυτταροπλάσματος κατά την αποκαρβοξυλίωση του γλουταμινικού και στο σημείο 2 στον εξωκυττάριο χώρο από μόριο GABA κάτι το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι το τελικό προϊόν της αποκαρβοξυλίωσης του γλουταμινικού, πιθανότατα λειτουργεί ως δέκτης πρωτονίων κατόπιν απελευθέρωσής του στο εξωκυτταρικό περιβάλλον και δημιουργεί προστατευτικό περιβάλλον (Εικόνα 4).

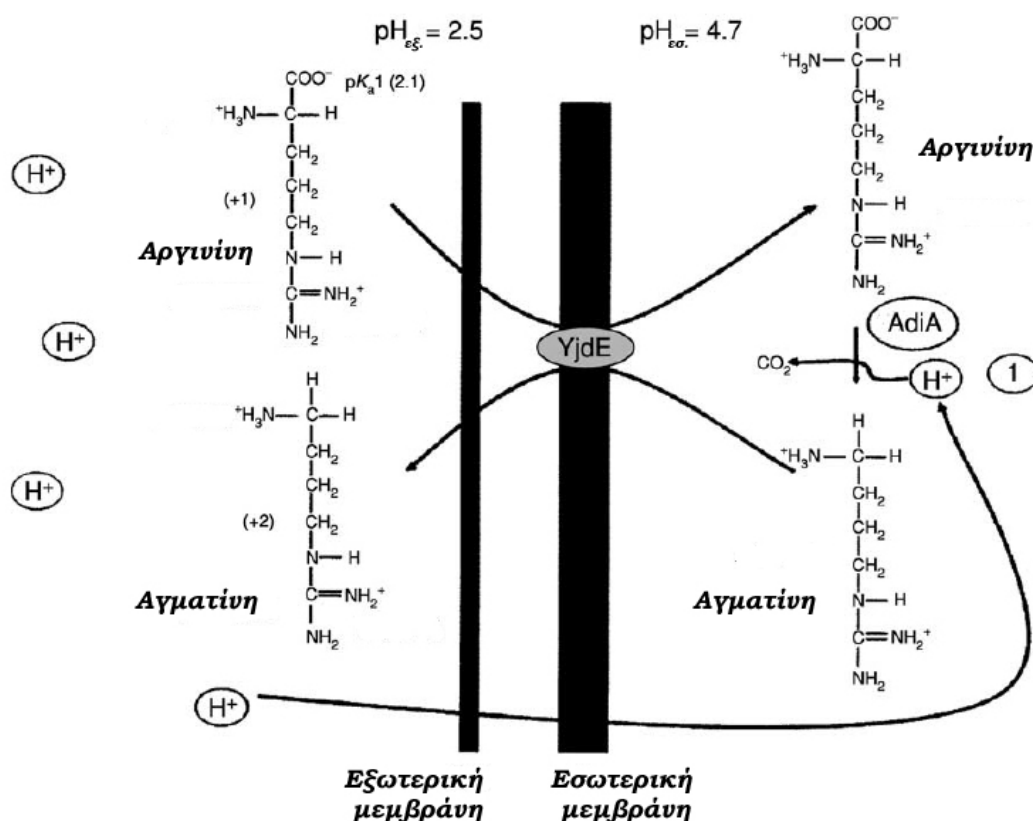


Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου μοντέλου δράσης του συστήματος ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση AR2, στην *E. coli*. (Richard και Foster, 2003)

1.2.2.3. Σύστημα οξεοανθεκτικότητας 3 (Acid Resistance system 3 – AR3)

Το σύστημα ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση AR3 εξαρτάται από την αργινίνη και έχει δομικά στοιχεία παρόμοια με εκείνα του συστήματος AR2. Το AR3 απαιτεί την αποκαρβοξυλίωση της αργινίνης (που κωδικοποιείται από το **adiA**) και ένα πρόσφατα προσδιορισμένο μεταφορέα αργινίνης:αγματίνης **YjdE** (που κωδικοποιείται από το γονίδιο **yjdE**-απαραίτητο για τη λειτουργία του AR3) προκειμένου να λειτουργήσει. Άλλοι σημαντικοί φορείς που είναι γνωστοί για τις επιπτώσεις τους στη μεταγραφική ρύθμιση του συστήματος AR3 είναι οι: CysB

(μέλος της οικογένειας ρυθμιστικών πρωτεϊνών LysR και απαραίτητη στην επαγωγή της έκφρασης του *adiA* υπό όξινες συνθήκες (Shi και Bennett, 1994)), RpoA, CRP, AdiY, H-NS, και IHF. Η *E.coli* διαθέτει δύο γονίδια αποκαρβοξυλίωσης της αργινίνης, τα **speA** και **adiA**, με τη μεν αποκαρβοξυλάση **SpeA** να είναι ένα βιοσυνθετικό ένζυμο σημαντικό για τη βιοσύνθεση πολυαμίνης ενώ η δε **AdiA** να είναι η μοναδική εκ των δύο αποκαρβοξυλασών του συστήματος που επάγεται σε όξινες συνθήκες προκαλώντας ανθεκτικότητα στην καταπόνηση και παράλληλα παίζει κρίσιμο ρόλο στη λειτουργία του AR3 (Glansdorff, 1996). Οι βέλτιστες τιμές pH αυτών των δύο ενζύμων 8.4 και 5.2 αντίστοιχα, συμβαδίζουν και με το ρόλο τους σε μη καταπονημένα και όξινα καταπονημένα κύτταρα (Boeker και Snell, 1972).



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου μοντέλου δράσης του συστήματος ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση AR3, στην *E.coli*. (Richard και Foster, 2003)

Λαμβάνοντας υπόψη τις ομοιότητες μεταξύ των δομικών στοιχείων των συστημάτων AR2 και AR3, οι μηχανισμοί από τους οποίους διέπεται η παροχή προστασίας-ανθεκτικότητας πιθανότατα είναι και αυτοί ίδιοι. Έτσι, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 5 σε περιβάλλον με όξινο pH (2.5) πρωτόνια κινούνται εντός του κυττάρου με συνακόλουθη αύξηση της κυτταροπλασματικής οξύτητας. Προκειμένου

το κύτταρο να διατηρήσει την ομοιόστασή του αργινίνη μεταφέρεται από τον YjdE μεταφορέα αργινίνης:αγματίνης στο κυτταρόπλασμα και αποκαρβοξυλιώνεται από την AdiA προς αγματίνη, με τη δέσμευση ενός πρωτονίου (βλ. Εικόνα 5 σημείο 1) και απελευθέρωση CO₂. Η αγματίνη στη συνέχεια, όπως και το GABA στο σύστημα AR2, μεταφέρεται εκτός κυττάρου με συνακόλουθη λήψη αργινίνης. Σε αντίθεση όμως με το GABA, η αγματίνη δεν μπορεί να γίνει δέκτης πρωτονίων κατά τη μετάβασή της από εσωτερικό pH 4-4.5 σε εξωτερικό pH κοντά στο 2.5, κάτι το οποίο έχει ως συνέπεια τη μη δυνατότητα εξουδετέρωσης του εξωτερικού όξινου περιβάλλοντος.

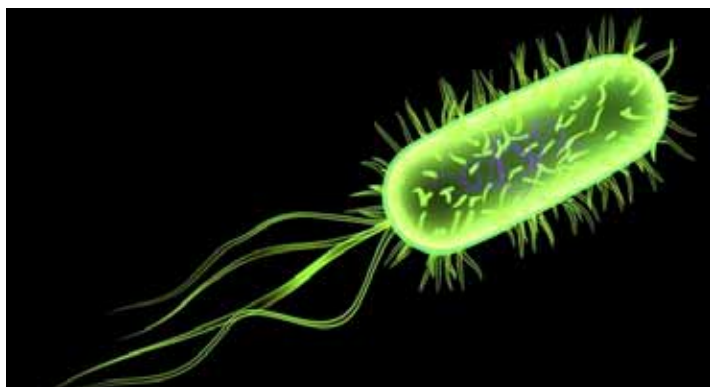
1.3. Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes*

1.3.1 Εισαγωγή και ιστορικά στοιχεία

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes*, αιτία για την ανθρώπινη και ζωϊκή λιστερίωση, είναι ένας από τους πιο μελετημένους μικροοργανισμούς των τελευταίων 20 ετών. Αν και είχε γίνει αναφορά στο μικροοργανισμό από το 1891, πρώτος ο Murray περιέγραψε αυτό το μικροοργανισμό ως αιτία για τη ζωϊκή ασθένεια το 1926. Λόγω του ότι το παθογόνο προκαλούσε 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 της *Listeria* έγινε το 1929. Εντούτοις, το ενδιαφέρον για αυτόν τον οργανισμό αυξήθηκε γρήγορα μετά από μια σειρά τροφικών κρουσμάτων κατά τη δεκαετία του '80. Το υψηλό ποσοστό θνησιμότητας μεταξύ αυτών των κρουσμάτων έχει επιστήσει την προσοχή των ανθρώπων που συμμετέχουν στην υγιεινή και ασφάλεια των τροφίμων. Τεράστια ποσά γνώσης έχουν συσσωρευθεί στον τομέα της λιστερίωσης αλλά και για τον ίδιο το μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*. Τα τελευταία 20 χρόνια έχουν δημοσιευθεί έρευνες σε βάθος σχετικά με τη λιστέρια και τη λιστερίωση (Lovett, 1989· Farber και Peterkin, 1991· Roccourt και Cossart., 1997· Schlech III, 2000).

1.3.2. Ο μικροοργανισμός και τα χαρακτηριστικά του

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είναι θετικός κατά Gram, μικροαερόφιλος, μη-σποριογόνος βάκιλλος, με διαστάσεις 0.4-0.5 μm διάμετρο και 0.5-2 μm μήκος. Σε καλλιέργειες 3 έως 5 ημερών απαντώνται νηματώδεις κατασκευές. Το βακτήριο *L. monocytogenes* είναι πολύ κινητικό με τη βοήθεια τεσσάρων περίτριχων μαστιγίων και χαρακτηριστικό της είναι η περιστροφική κίνηση που χρησιμοποιείται συχνά ως συμβατικός δείκτης για τον προσδιορισμό της (Εικόνα 6). Ο βαθμός της κινητικότητας της εξαρτάται από τη θερμοκρασία και είναι μέγιστος όταν η θερμοκρασία αύξησης κυμαίνεται μεταξύ 20 και 25°C. Από 37°C και πάνω, η παραγωγή μαστιγίων μειώνεται σημαντικά με αποτέλεσμα μείωση της κινητικότητας (Lovett, 1989· Farber και Peterkin, 1991). Αναπτύσσεται καλά στα περισσότερα κοινά θρεπτικά υποστρώματα, συμπεριλαμβανομένου του brain heart infusion broth (BHI), του tryptic-soy broth με 0.6% yeast extract (TSBYE), το Luria broth (LB)



Εικόνα 6. Τρισδιάστατη απεικόνιση του βακίλλου της *Listeria monocytogenes*.
(<http://www.meningitis101.com/bacterial-meningitis-lg.jpg>)

κ.λπ. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης της είναι οι 35-37°C αν και αυξάνεται αρκετά καλά και σε θερμοκρασίες κοντά στους 4°C, ενώ ο ρυθμός αύξησης μειώνεται καθώς η θερμοκρασία μειώνεται. Το βέλτιστο εύρος pH είναι 5-9.

Σε υποστρώματα με βάση το άγαρ οι αποικίες του βακτηρίου είναι διαφανείς με μια χαρακτηριστική γαλαζοπράσινη γυαλάδα όταν αντικρίζονται υπό κλίση. Στο blood sheep agar στους 37°C, οι αποικίες είναι ελαφρώς μικρότερες απ'ότι στο TSBYE ή BHI agar και παράγουν μια αδύνατη ζώνη αιμόλυσης. Η *L. monocytogenes* μπορεί επίσης να αναπτυχθεί σε ορισμένα συνθετικά και ημισυνθετικά μέσα, αλλά οι ρυθμοί ανάπτυξης είναι πολύ πιο αργοί απ'ότι στα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά υποστρώματα (Lovett, 1989· Farber και Peterkin, 1991). Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* παράγει μια β-αιμολυσίνη μοριακού βάρους 58 kDa, την λιστεριολυσίνη O, η οποία ενεργεί συνεργιστικά με την αιμολυσίνη που παράγεται από το *Staphylococcus aureus* για να προκαλέσει αυξημένη αιμόλυση στο blood agar. Αυτή η αντίδραση αποτελεί τη βάση μιας χρήσιμης διαγνωστικής δοκιμής για τη διάκριση των *L. monocytogenes* και *L. innocua*, και είναι γνωστό ως δοκιμή CAMP από τα αρχικά των Christie, Atkins, και Munch-Peterson που περιέγραψαν αρχικά το φαινόμενο με τους στρεπτοκόκκους Β ομάδας.

1.3.3. Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά

Η διάσπαρτη παρουσία του παθογόνου στο περιβάλλον υποδηλώνει ότι η ανθρώπινη έκθεση στο παθογόνο αυτό βακτήριο πρέπει να είναι συχνή. Εντούτοις η πιθανότητα εκδήλωσης λιστερίωσης είναι χαμηλή δεδομένου ότι η παθογένεια θα εκδηλωθεί μόνο εάν ένα ευαίσθητο άτομο εκτεθεί σε μια αρκετά υψηλή δόση κάποιου στελέχους. Οι περίοδοι επώασης για την ασθένεια ποικίλουν από 1 έως 90 ημέρες, κάτι το οποίο καθιστά τον «εντοπισμό» των ένοχων τροφίμων δύσκολο εάν όχι αδύνατο. Τα συμπτώματα της ασθένειας που θα εμφανιστούν πιθανότατα σε γυναίκες εγκύους, νήπια ή ηλικιωμένους και ανοσοκατεσταλμένους, ποικίλουν από μια ήπια

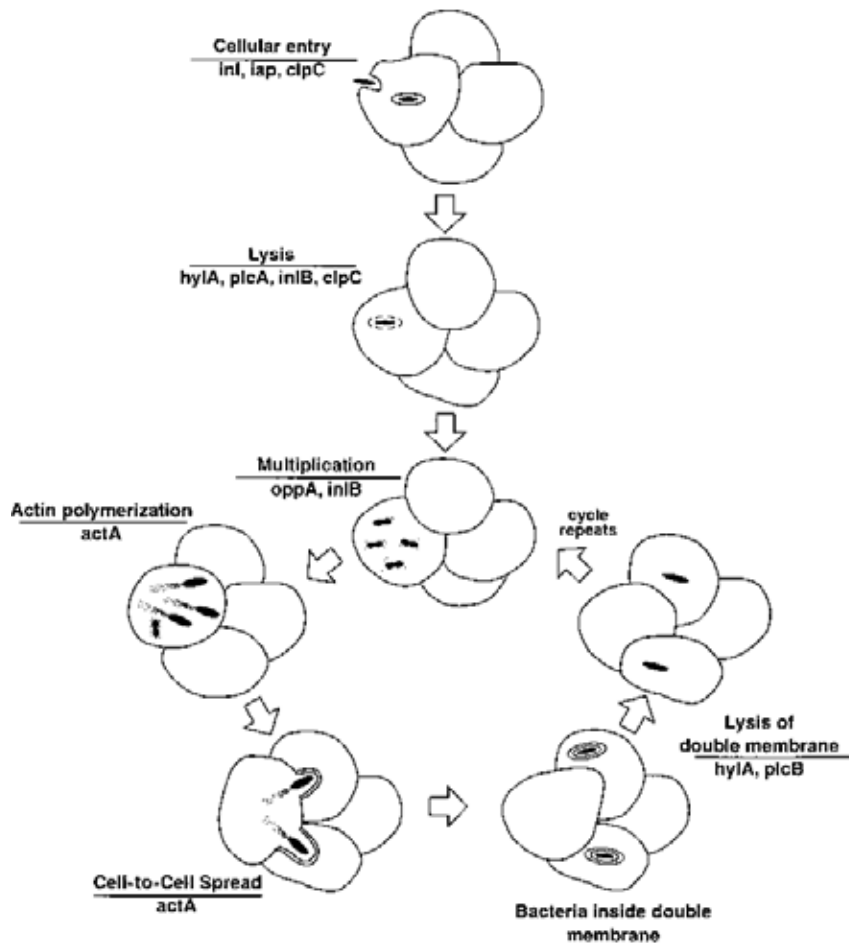
ασθένεια τύπου γρίπης μέχρι μηνιγγίτιδα, μηνιγγοεγκεφαλίτιδα και ενδοκαρδίτιδα. Η λιστερίωση στους ενήλικες έχει έναν υψηλό βαθμό θνησιμότητας με τους αριθμούς να δείχνουν ακόμα και ποσοστά της τάξης του 35%.

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είναι ένα προαιρετικό ενδοκυτταρικό παθογόνο το οποίο όπως το *Mycobacterium*, η *Brucella* και άλλα μπορεί να επιζήσει και να πολλαπλασιαστεί στα κύτταρα του συστήματος «μονοκύτταρο-μακροφάγο». Ο μικροοργανισμός διαπερνά το έντερο με τη διαδικασία της ενδοκύτωσης η οποία υποβοηθείται από διάφορους παράγοντες συμπεριλαμβανομένης της **ιντερναλίνης**, μιας βακτηριακής πρωτεΐνης επιφανείας 800 αμινοξέων που κωδικοποιείται από ένα χρωμοσωμικό γονίδιο το **inlA**, άλλων προϊόντων της *inl* οικογένειας γονιδίων, και την **p60**, μια εξωκυτταρική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 60 kDa. Αποτέλεσμα αυτής της ενδοκύτωσης είναι ο εσωκλεισμός του βακτηρίου σε ένα φαγόσωμα. Στον Πίνακα 2 που ακολουθεί παρουσιάζονται κάποια γονίδια του βακτηρίου *L. monocytogenes* γνωστά για τη λοιμοτοξικότητά τους (virulence).

Πίνακας 2. Γονίδια του βακτηρίου *L. monocytogenes* γνωστά για την λοιμοτοξικότητά τους.

Γονίδιο	Ιδιότητα
<i>hly</i>	αιμολυσίνη (λίστεριολυσίνη O) 58 kDa
<i>plcA</i>	Φωσφολιπάση C 38-kd εξειδικευμένη στη φωσφατιδυλο-inositolόλη
<i>plcB</i>	Λεκιθινάση 29 και 32 kDa πολυπεπίδια
<i>mpl</i>	Λεκιθινάση
<i>actA</i>	Επιφανειακή πρωτεΐνη 90 kDa
<i>inlA</i>	Ιντερνάλη 88 kDa πρωτεΐνη (744 αμινοξέα)
<i>inlB</i>	Ιντερναλίνη 65 kDa πρωτεΐνη (630 αμινοξέα). Το γονίδιο εμπλέκεται στην ηπατική προσβολή
<i>inlC(irpA)</i>	Πρωτεΐνη 30 kDa ομόλογη με τις πρωτεΐνες InlA, InlB
<i>prfA</i>	Μεταγραφικός εκκινητής των <i>hly</i> , <i>plcA</i> , <i>plcB</i> , <i>actA</i> , <i>inlA</i> , <i>inlB</i> , and <i>mpl</i> με μοριακό βάρος 27 kDa. Μέλος της οικογένειας CAP/FnR
<i>imt</i>	Μετάλλαξη της αδρανοποιεί την ενδοκυτταρική κινητικότητα. Ο πολυμερισμός της ακτίνης είναι φυσιολογικός αλλά δεν μπορεί να δημιουργήσει κίνηση
<i>oppA</i>	Πρωτεΐνη 62 kDa σύνδεσης ολιγοπεπτιδίων και συμμετέχει στην ενδοκυτταρική επιβίωση και ανάπτυξη
<i>clpC</i>	Μεταγραφικός τροποποιητής 100 kDa που συμμετέχει στην προσκόλληση και επίθεση και ρυθμίζει την έκφραση των <i>inlA</i> , <i>inlB</i> , and <i>actA</i>
<i>iap</i>	Πρωτεΐνη 60 kDa που σχετίζεται με την εξωκυτταρική επίθεση· επίσης γνωστή ως p60

Προκειμένου να πολλαπλασιαστεί ενδοκυτταρικά ο μικροοργανισμός πρέπει να επιζήσει στο φαγόσωμα και να διαφύγει γρήγορα προτού καταστραφεί από τα λυσοσώματα, μια διαδικασία που θα σκότωνε το βακτήριο. Το παθογόνο βακτήριο *L. monocytogenes* παράγει τη λιστεριολυσίνη O (LLO) μια αιμολυσίνη μοριακού βάρους 58 kDa, που αποδομεί το διπλή λιπώδη μεμβράνη του φαγοσώματος και επιτρέπει στο βακτήριο να «δραπετεύσει» από το φαγόσωμα. Στην πλειονότητά τους τα στελέχη *L. monocytogenes* που μολύνουν τα επιθηλιακά κύτταρα το κάνουν αυτό προκειμένου να απελευθερωθούν στο κυτταρόπλασμα. Μόνο το 10% των κυττάρων *L. monocytogenes* που εισβάλλουν στα μονοκύτταρα επιβιώνει, το υπόλοιπο 90% καταστρέφεται. Κατά τη διάρκεια του ενδοκυτταρικού πολλαπλασιασμού, η ακτίνη πολυμερίζεται γύρω από την επιφάνεια του βακτηρίου, μια διαδικασία που προωθεί το βακτηριακό κύτταρο εντός του κυττάρου-ξενιστή αλλά και σε παρακείμενα κύτταρα, μεταδίδοντας με αυτό τον τρόπο το μικροοργανισμό αποφεύγοντας παράλληλα το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (Εικόνα 7). Τα βακτηριακά κύτταρα φθάνοντας στους μεσεντερικούς λεμφαδένες μεταδίδονται εντός του οργανισμού μέσω του αίματος. Το συκώτι διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στην εξάλειψη του μικροοργανισμού και τον έλεγχο της μόλυνσης. Η μόλυνση των ηπατοκυττάρων προκαλεί μια έντονη υπεραιμική αντίδραση. Τα πολυμορφοπυρηνικά κύτταρα (ουδετερόφιλα) καταστρέφουν τα μολυσμένα ηπατοκύτταρα αναγκάζοντας τα να απελευθερώσουν τα βακτήρια που τα έχουν προσβάλλει τα οποία με τη σειρά τους καταστρέφονται κι αυτά. Όπου η μόλυνση δεν ελέγχεται πλέον στο συκώτι, μπορεί να διαδοθεί περαιτέρω διαμέσου του αίματος στο κεντρικό νευρικό σύστημα ή τον πλακούντα προκαλώντας πολύ πιο σοβαρή ασθένεια.



Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση των διαφορετικών σταδίων δράσης του βακτηρίου *L. monocytogenes* καθώς και των γνωστών γονιδίων που συνδέονται με τη λοιμοτοξικότητά της. (International handbook of foodborne pathogens, 2003)

1.3.4. Συσχετισμός με τα τρόφιμα

Περιπτώσεις λιστερίωσης έχουν αναφερθεί από σχεδόν όλα τα μέρη του κόσμου. Η τρέχουσα εκτίμηση της συχνότητας λιστερίωσης 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 λιστερίωσης 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. Από τον Πίνακα 3 γίνεται σαφές ότι όλα τα τρόφιμα που συνδέθηκαν κατά το παρελθόν με πρόκληση λιστερίωσης καταναλώθηκαν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία ή μετά από ελάχιστη θερμική επεξεργασία (π.χ. χοτ ντογκ) και ότι πολλά από αυτά τα τρόφιμα παρέχουν ένα κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη του παθογόνου αυτού μικροοργανισμού (π.χ. μαλακό τυρί). Αν και όλοι οι ορότυποι *L. monocytogenes* θεωρούνται εν δυνάμει παθογόνοι, οι έρευνες δείχνουν ότι κυρίαρχοι ορότυποι είναι οι 1/2a, 1/2b και 4b κάτι το οποίο φαίνεται να ισχύει και για τις σποραδικές περιπτώσεις. Μόνο η περίπτωση λιστερίωσης ασθενών σε πτέρυγα νοσοκομείου στη Φινλανδία (1998-99) περιελάμβανε ορότυπο διαφορετικό των 1 ή 4 (ορότυπος 3a). Δεν είναι σαφές γιατί οι άλλοι ορότυποι δεν έχουν διάδοση και δεν απομονώνονται από ασθενείς αλλά υπάρχει περίπτωση να μην καθίσταται δυνατή η επιβίωσή τους εντός των τροφίμων ή εντός του ξενιστή. Είναι επίσης πιθανό ότι τα στελέχη που ανήκουν σε αυτούς τους ορότυπους στερούνται κάποιας ουσιαστικής λειτουργίας που απαιτείται για να δημιουργήσει μόλυνση.

Από την άλλη μεριά υπάρχουν διάφορες βασικές αρχές που μπορούν να υιοθετηθούν προκειμένου να μειωθεί η έκθεση στο επικίνδυνο αυτό παθογόνο. Τα αγροτικά προϊόντα θα πρέπει να παράγονται υπό συνθήκες που ελαχιστοποιούν την παρουσία *L. monocytogenes* σε αυτά και να ακολουθούνται αυστηρά οι κανόνες ορθής γεωργικής πρακτικής (GAP) καθώς και οι κανόνες ορθής βιομηχανικής πρακτικής (GMP) προκειμένου να μειωθεί η πιθανότητα μόλυνσης των εγκαταστάσεων επεξεργασίας τροφίμων. Η εφαρμογή του συστήματος HACCP και

ορισμένων μέτρων ελέγχου (control measures) επί της παραγωγικής διαδικασίας θα ήταν επίσης χρήσιμη αφού θα μείωνε περαιτέρω την πιθανότητα μόλυνσης στους χώρους παραγωγής και διάθεσης τροφίμων.

Πίνακας 3. Τα μεγαλύτερα κρούσματα τροφιμογενών λιστεριώσεων (International handbook of foodborne pathogens, 2003).

Έτος	Τρόφιμο	Χώρα	Κρούσματα (% θνησιμότητα)
1980–81	Λαχανοσαλάτα (ωμά λαχανικά)	Καναδάς	41(34)
1983	Παστεριωμένο γάλα	Μασαχουσέτη	49(29)
1984	Μαλακό τυρί	Ελβετία	57(32)
1985	Τυρί Jalisco (μεξικανικού τύπου από απαστερίωτο γάλα)	Καλιφόρνια	142(34)
1987–89	Πατέ	Ηνωμένο Βασίλειο	823(άγνωστο)
1992	Μερίδες χοιρινού	Γαλλία	38(32)
1993	Ριζοσαλάτα	Ιταλία	39(0)
1994	Σοκολατούχο γάλα	Ιλλινοϊς	45(0)
1997	Σαλάτα καλαμποκιού	Ιταλία	1566(0)
1998–99	Χοι ντόγκ, έτοιμα προς κατανάλωση κρεατοσκευάσματα	ΗΠΑ	101(21)
1998–99	Βούτυρο	Φινλανδία	25(24)
1999	Γλώσσα χοιρινού	Γαλλία	32(31)
2000	Έτοιμα προς κατανάλωση κρεατοσκευάσματα γαλοπούλας	ΗΠΑ	29(7)

1.4. Επιβίωση του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* υπό συνθήκες όξινης καταπόνησης

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. Η προσαρμοστική απόκριση λοιπόν, που καλείται ανθεκτικότητα στην όξινη καταπόνηση (acid tolerance response-ATR), περιλαμβάνει απόκτηση όξινης αντοχής μετά από σύντομη έκθεση σε ήπια όξινες συνθήκες με αποτέλεσμα αλλαγή της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Αυτό δημιουργεί μια κατάσταση στην οποία ο μικροοργανισμός μπορεί να παράγει πρωτεΐνες όξινης καταπόνησης (Acid Shock Proteins-ASPs) όταν υποβάλλεται σε συνθήκες έντονης

πρόκληση ή ακόμα και σε θανατηφόρο pH (Foster, 1991· Foster et al., 1994· Kroll και 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 στην καταπόνηση με την παθογένεση του μικροοργανισμού (Conte et al., 2000, 2002· Gahan και Hill, 1999). Επιπλέον το βακτήριο *L. monocytogenes* όχι μόνο επιζεί της όξινης καταπόνησης αλλά και απαιτεί πτώση του pH προκειμένου να ενεργοποιήσει την αιμολυσίνη του προκειμένου να διαφύγει από το μακροφάγο φαγόσωμα. Επιπλέον διαθέτει και άλλους μηχανισμούς ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση όπως είναι η αποκαρβοξυλάση του γλουταμινικού, την απαμινάση της αργινίνης και το σύστημα της F₀F₁ ATPασης.

1.4.1. Το σύστημα GAD και ο ρόλος του παράγοντα σ^B στη ρύθμισή του

Το σύστημα αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού (glutamate decarboxylase system, GAD) προσδίδει στο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* (όπως και στο μικροοργανισμό *E. coli*) την ανθεκτικότητα που χρειάζεται για να ανταπεξέλθει στις ακραία όξινες συνθήκες του περιβάλλοντος (π.χ. γαστρικό υγρό). Έτσι, το σύστημα GAD αντιπροσωπεύει τον κύριο μηχανισμό για τη διατήρηση της ομοιόστασης του pH στο βακτήριο *L. monocytogenes* σε τέτοιου είδους περιβάλλον. Επιπροσθέτως το σύστημα GAD (*gadT1*) φαίνεται να παίζει ρόλο στην επιβίωση του παθογόνου στη χολή, ενδεχομένως εξουδετερώνοντας το χαμηλό κυτταροπλασματικό pH που προκύπτει από τον ενδοκυτταρικό διαχωρισμό των χολικών αλάτων (Begley et al., 2002). Ο τρόπος δράσης καθώς και τα γονίδια που κωδικοποιούν τα εμπλεκόμενα σ’ αυτό το σύστημα στοιχεία (αποκαρβοξυλάσες του γλουταμινικού οξέος, αντιμεταφορέας γλουταμινικού:γ-αμινοβουτυρικού οξέος) περιγράφονται στην ενότητα 1.2.2.2. λεπτομερώς. Μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί στο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* τρία γονίδια των αποκαρβοξυλασών του γλουταμινικού οξέος (*gadD1:lmo0447*, *gadD2:lmo2363*, και *gadD3:lmo2434*) και δύο του αντιμεταφορέα γλουταμινικού:γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) (*gadT1:lmo0448* και *gadT2:lmo2362*), που βρίσκονται σε τρεις ευδιάκριτες περιοχές (Conte et al., 2002· Cotter et al., 2001· Cotter et al., 2005). Τα γονίδια *gadD1T1* αποτελούν μέρος ενός οπερονίου πέντε γονιδίων και εμπλέκονται στην ανάπτυξη της *L.monocytogenes* σε ήπια όξινα περιβάλλοντα, ενώ το οπερόνιο των *gadD2T2* (Cotter P. et al., 2001) έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στην επιβίωση σε συνθήκες ισχυρά

όξινης καταπόνησης. Τα ανωτέρω συντείνουν στο γεγονός ότι η λειτουργία του συστήματος GAD είναι απαραίτητη για την ανθεκτικότητα του βακτηρίου *L. monocytogenes* σε συνθήκες όξινης καταπόνησης.

Η σύνθετη μεταγραφική διαδικασία των *gad* γονιδίων στο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* έδειξε ότι υπάρχει μια πληθώρα ρυθμιστικών παραγόντων που περιλαμβάνονται στη ρύθμιση του συστήματος GAD. Ο ρόλος του παράγοντα σίγμα B (σ^B) στην προσαρμογή των θετικών κατά Gram βακτηρίων έχει αποσπάσει ιδιαίτερα την προσοχή κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών. Όσον αφορά στο μικροοργανισμό *L. monocytogenes*, ο παράγον σ^B που κωδικοποιείται από το γονίδιο **sigB** έχει αποδειχθεί ότι παίζει ρόλο στην όξινη, οξειδωτική και ωσμωτική ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού, καθώς επίσης και σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας και έλλειψης πηγής άνθρακα από το μέσο ανάπτυξης. Από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο βακτήριο *L. monocytogenes* LO28 φάνηκε ο κρίσιμος ρόλος του GAD στην επιβίωση του στελέχους στο γαστρικό χυμό (pH 2.5), ενώ στο ίδιο όξινο μέσο καταδείχθηκε και ο ρόλος του παράγοντα σ^B αλλά στο στέλεχος *L. monocytogenes* 10403S. Από αυτά τα πειράματα φάνηκε ότι στη *L. monocytogenes* θα μπορούσε ενδεχομένως το σ^B να ρυθμίσει το σύστημα GAD. Στο στέλεχος *L. monocytogenes* 10403S αυτό που επίσης φάνηκε και έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι ότι η λειτουργία του GAD και στο στέλεχος με αδρανοποιημένο το γονίδιο που κωδικοποιεί τον παράγοντα σ^B και στο αγρίου τύπου στέλεχος δεν διέφερε, όπως επίσης διαφορά δεν παρατηρήθηκε και στη μετακίνηση πρωτονίων διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, δείχνοντας μ'αυτό τον τρόπο ότι η δραστηριότητα του GAD δεν είναι εξαρτώμενη από το σ^B κατά τη διάρκεια της στάσιμης φάσης στο συγκεκριμένο τουλάχιστον στέλεχος (Cotter et al., 2001· Ferreira et al., 2003). Παρολ'αυτά όμως πρόσφατες μελέτες στα στελέχη *L. monocytogenes* LO28 και EGDe έχουν δείξει ότι τα γονίδια *gad* (*gadD1T1*, *gadD2T2* και *gadD3*) σε όξινες συνθήκες ρυθμίζονται από το σ^B (Wempkamp-Kamphuis et al., 2004· Ryan, 2006). Επιπλέον οι Kazmierczak et al. (2003) παρείχαν περαιτέρω απόδειξη για τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, με αποτέλεσμα να βγαίνει το συμπέρασμα ότι η ρύθμιση του συστήματος GAD από τον παράγοντα σ^B , είναι μια συνάρτηση του στελέχους, της φάσης ανάπτυξης και του pH του μέσου.

1.4.2. Το σύστημα απαμινάσης της αργινίνης

Το σύστημα απαμινάσης της αργινίνης (arginine deiminase – ADI) έχει βρεθεί σε διάφορα βακτήρια και εμπλέκεται συχνά στη βακτηριακή ανθεκτικότητα σε όξινα περιβάλλοντα (Gruening et al., 2006). Τρία ένζυμα λαμβάνουν χώρα στο μεταβολικό μονοπάτι της απαμίνωσης και καταλύουν τη μετατροπή της αργινίνης σε ορνιθίνη, αμμωνία και διοξείδιο του άνθρακα. Αυτά είναι η απαμινάση της αργινίνης, η καταβολική καρβαμοϋλοτρανσφεράση της ορνιθίνης (catabolic ornithine carbamoyltransferase, cOTCase) και η καρβαμική κινάση (carbamate kinase). Η καταβολική καρβαμοϋλοτρανσφεράση της ορνιθίνης κωδικοποιούμενη από το *arcB* γονίδιο (lmo0036), ο μεταφορέας αργινίνης:ορνιθίνης κωδικοποιούμενος από το *arcD* (lmo0037) και η καρβαμική κινάση που κωδικοποιείται από το *arcC* (lmo0039) είναι μέρος ενός οπερονίου που περιέχει επίσης ένα επιπλέον γονίδιο (lmo0038) που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη της οικογένειας των απαμινασών της πεπτιδυλαργινίνης. Το γονίδιο της απαμινάσης της αργινίνης που κωδικοποιείται από το *arcA* (lmo0043) είναι χωρισμένο από τα άλλα γονίδια που περιλαμβάνονται στο σύστημα ADI από ένα μη χαρακτηρισμένο οπερόνιο τριών γονιδίων (lmo0040-lmo0042). Οι μελέτες έδειξαν ότι απώλεια του μεταφορέα αργινίνης:ορνιθίνης (*arcD*) οδήγησε στη μειωμένη ανθεκτικότητα της λιστέριας στην όξινη καταπόνηση, ενώ η ταυτόχρονη μετάλλαξη του μεταφορέα και του βιοσυνθετικού γονιδίου *arcG* της αργινίνης (αναβολισμός αργινίνης ενδοκυτταρικά) οδήγησε σε μια περαιτέρω αύξηση στην ευαισθησία υπό όξινες συνθήκες. Ο τρόπος δράσης του συστήματος ADI συνίσταται στο ότι η ορνιθίνη που παράγεται ενδοκυτταρικά ως αποτέλεσμα του καταβολισμού της αργινίνης μεταφέρεται εξωκυτταρικά με ταυτόχρονη εισαγωγή ενός μορίου αργινίνης από το μεταφορέα αργινίνης:ορνιθίνης. Για κάθε mole αργινίνης που καταβολίζεται μέσω του συστήματος ADI, δύο mole αμμωνίας (NH_3) και ένα mole ATP παράγεται. Η αμμωνία που παράγεται ως συνέπεια του καταβολισμού της αργινίνης, μπορεί να γίνει δέκτης ενδοκυτταρικών πρωτονίων και να παράξει ιόντα αμμωνίου (NH_4^+), αυξάνοντας μ'αυτό τον τρόπο το ενδοκυτταρικό pH και διατηρώντας την ομοιόσταση του pH. Η παροχή ATP μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μικροβιακή αύξηση υπό ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες ή εναλλακτικά, για να εξωθήσει τα πρωτόνια μέσω της F_0F_1 ATPάσης, που αποδεδειγμένα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση του pH στο βακτήριο *L. monocytogenes* (Cotter et al., 2000). Αν και το σύστημα ADI της λιστέριας εμπλέκεται στην ανάπτυξη και επιβίωση σε χαμηλό pH, δεν είναι εξίσου αποτελεσματικό όσο το σύστημα GAD.

1.5. Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Salmonella* spp.

1.5.1 Εισαγωγή και ιστορικά στοιχεία

Τα περισσότερα στελέχη του είδους *Salmonella* spp. θεωρούνται ως ανθρώπινα παθογόνα, αν και διαφέρουν στα χαρακτηριστικά και τη δριμύτητα της ασθένειας που προκαλούν. Ο τυφοειδής πυρετός είναι το πιο δριμύ αλλά και το πρώτο χαρακτηριστικό της μόλυνσης από σαλμονέλλα που περιγράφηκε αξιόπιστα. Αυτό οφείλεται στο Bretonneau το γάλλο παθολόγο που θεωρείται επίσης ιδρυτής του δόγματος της αιτιολογικής ιδιομορφίας της ασθένειας. Κατά τη διάρκεια της ζωής του έκανε μόνο μια δημοσίευση το 1829 και η πραγματεία του στο θέμα του τυφοειδούς πυρετού δημοσιεύθηκε ένα αιώνα σχεδόν αργότερα το 1922 από έναν από τους απογόνους του. Το 1856, ο άγγλος παθολόγος William Budd κατέληξε στο συμπέρασμα ότι κάθε περίπτωση τυφοειδούς προσβολής συνδέεται επιδημιολογικά με μια προηγούμενη περίπτωση και ότι μια συγκεκριμένη τοξίνη αποβάλλεται με τα περιττώματα των ασθενών. Ο τυφοειδής βάκιλος παρατηρήθηκε αρχικά από τους γερμανούς βακτηριολόγους Eberth και Koch το 1880 και τέσσερα χρόνια αργότερα ο Gaffky πέτυχε την καλλιέργειά του. Οι παρατυφοειδείς βάκιλοι, αρμόδιοι για την κλινικά παρόμοια κατάσταση, παρατυφοειδή πυρετό, απομονώθηκαν αρχικά από τους Achard και Bensaude (1896) και Gwyn (1898), ενώ ο Schottmuller το 1901 επιβεβαίωσε τη διάκριση τους από ορολογική απόψεως από τους τυφοειδείς βακίλλους. Οι Salmon και Smith το 1885 απομόνωσαν το μικροοργανισμό *Bacillus cholerae-suis* από άρρωστους χοίρους με χολέρα (μια ασθένεια που τώρα είναι γνωστό ότι έχει ιογενή προέλευση) και μια πληθώρα άλλων στελεχών που προκαλούσαν τροφιμογενείς ασθένειες και ζωικές προσβολές. Το γένος *Salmonella* spp. δημιουργήθηκε τελικά το 1900 από το Lignieres και ονομάστηκε έτσι προς τιμήν του αμερικανού παθολόγου κτηνίατρου D.E. Salmon, που πρώτος περιέγραψε το μικροοργανισμό *Salmonella cholerae-suis*.

Η σαλμονέλλα έχει πλέον καθιερωθεί ως μια από τις σημαντικότερες αιτίες τροφιμογενούς ασθένειας παγκοσμίως. Το σχέδιο ταξινόμησης ανά ορότυπο των Kauffman-White έχει αποδειχτεί η πιο χρήσιμη τεχνική για ορισμό διαφοροποιήσεων εντός του γένους. Αυτή η τεχνική περιγράφει τους μικροοργανισμούς βάσει των σωματικών αντιγόνων τους (O) και των αντιγόνων των μαστιγίων (H) αλλά και βάσει των αντιγόνων των καψιδίων (Vi) (που διαθέτουν τα στελέχη *S. typhi*, *S. dublin* και σε μερικές περιπτώσεις στελέχη *S. paratyphi*). Για να υπάρξει η δυνατότητα

ταξονομικής ορθότητας το serovar όνομα δεν αναγράφεται με πλάγια γραφή και χρησιμοποιείται μετά από το όνομα του είδους, έτσι ώστε το βακτήριο *S. typhimurium* να αποκαλείται *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ή πιο συνοπτικά, *Salmonella typhimurium*.

1.5.2. Ο μικροοργανισμός και τα χαρακτηριστικά του

Ο μικροοργανισμός *Salmonella* spp. είναι μέλος της οικογένειας *Enterobacteriaceae*. Είναι αρνητικό κατά Gram, προαιρετικά αναερόβιο μη σποριογόνο βακτήριο σε σχήμα βακίλλου (διαστάσεις 0.5 μm επί 1-3 μm) (Εικόνα



Εικόνα 8. Φωτογραφία από ηλεκτρονικό σαρωτή που απεικονίζει τους βακίλλους του βακτηρίου *Salmonella* spp. κατά την επίθεση τους σε ανθρώπινο ιστό. (http://www3.niaid.nih.gov/topics/BiodefenseRelated/Biodefense/PublicMedia/image_library.htm)

8), θετικό στην καταλάση, αρνητικό στην οξειδάση με περίτριχα μαστίγια που προσδίδουν κινητικότητα. Ανάπτυξη έχει καταγραφεί σε θερμοκρασίες ακριβώς από 5°C μέχρι 47°C με βέλτιστη τιμή τους 37°C. Οι σαλμονέλες είναι θερμοευαίσθητες και καταστρέφονται εύκολα από τις θερμοκρασίες παστερίωσης. Το στέλεχος *S. senftenberg* 775W είναι ο πιο ανθεκτικός στη θερμότητα ορότυπος σε

υψηλές τιμές a_w και έχει D_{72} στο γάλα 0.09 min. Ελάχιστη a_w για την αύξηση είναι περίπου 0.93 αλλά τα κύτταρα της επιζούν καλά στα ξηρά τρόφιμα, με το ποσοστό επιβίωσης να αυξάνεται καθώς η a_w μειώνεται. Το ελάχιστο pH για την ανάπτυξη ποικίλλει με το όξινο να είναι στο 5.4 (ρυθμισμένο με οξικό οξύ) και σε 4.05 (ρυθμισμένο με υδροχλωρικό και κιτρικό οξύ). Η βέλτιστη ανάπτυξη παρατηρείται γύρω σε pH 7. Το γένος *Salmonella* έχει διαιρεθεί σε τρία είδη: Το *S. typhi*, *S. choleraesuis*, και *S. enterica*. Τα γένη του είδους *Salmonella* είναι πρωτίστως κάτοικοι του γαστρεντερικού συστήματος. Ανεύρισκονται σε ένα ευρύ φάσμα ζώων που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, αγρίων ζώων, τρωκτικών, κατοικίδιων ζώων, πουλιών, ερπετών και εντόμων, συνήθως χωρίς να εμφανίζουν οποιασδήποτε

μορφής ασθένεια στους ξενιστές. Μπορούν να διαδοθούν μέσω των περιττωμάτων στο χώμα, το νερό, τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές και από εκεί σε άλλα ζώα (συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου). Οι περισσότερες σαλμονέλες μολύνουν ένα μεγάλο εύρος ζωικών ειδών ενώ μερικοί ορότυποι προσαρμόζονται ανάλογα με τον ξενιστή, όπως είναι το στέλεχος *S. enteritidis* PT4, *S. pullorum* και *S. gallinarum* στα πουλερικά και το *S. cholerae-suis* στους χοίρους. Σε αυτές τις περιπτώσεις η άμεση μετάδοση από ζώο σε ζώο μπορεί να είναι σημαντικότερη αφού μπορεί να εμφανιστεί κυκλική μετάδοση από τους γονείς στους απογόνους όπως στην περίπτωση του στελέχους *S. enteritidis* PT4.

1.5.3. Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά

Ο μικροοργανισμός *Salmonella* spp. είναι υπεύθυνος για έναν αριθμό διαφορετικών κλινικών συνδρόμων που ομαδοποιούνται εδώ ως εντερίτιδα και συστηματική νόσος.

▪ **Εντερίτιδα.** Οι γαστρεντερικές μολύνσεις είναι κυρίως συνδεδεμένες με εκείνους τους ορότυπους που εμφανίζονται ευρέως στα ζώα και τους ανθρώπους. Μπορούν να κυμανθούν από πλευράς δριμύτητας από ασυμπτωματική μεταφορά μέχρι διάρροια που είναι και ο πιο κοινός τύπος σαλμονέλλωσης. Η περίοδος επώασης για εντερίτιδα είναι μεταξύ 6 και 48 ωρών. Τα κύρια συμπτώματα του ήπιου πυρετού, της ναυτίας, του εμετού, των κοιλιακών πόνων και της διάρροιας διαρκούν για μερικές ημέρες αλλά σε μερικές περιπτώσεις, μπορούν να εμμείνουν για μια εβδομάδα ή περισσότερο. Η ασθένεια συνήθως περιορίζεται από μόνη της με την πάροδο του χρόνου αλλά μπορεί να καταστεί πιο σοβαρή στις ιδιαίτερα ευαίσθητες ομάδες πληθυσμού, όπως στους πολύ νέους, στους πολύ ηλικιωμένους και στους ήδη ασθενείς. Κατόπιν κατάποσης, ο μικροοργανισμός θα επιζήσει της διέλευσης μέσω του όξινου περιβάλλοντος του στομάχου, θα προσκολληθεί στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου μέσω συνδέσμων ανθεκτικών στη μανόζη (Εικόνα 8). Στη συνέχεια εισάγονται εντός των κυττάρων με μια διαδικασία γνωστή ως ενδοκύτωση μέσω δέκτη (receptor mediated endocytosis). Η ικανότητα της *Salmonella* spp. να εισάγεται σε μη φαγοκυτταρικά κύτταρα προσδίδει ουσιαστική δυναμικότητα στην παθογένειά της. Η κατανόηση της μοριακής βάσης αυτής της διαδικασίας έχει αυξηθεί αρκετά με την ανακάλυψη ότι κωδικοποιείται κατά ένα μεγάλο μέρος από μια περιοχή 35-40 kb του χρωμοσώματος, που περιγράφεται ως περιοχή παθογένειας. Αυτή η περιοχή του DNA κωδικοποιεί ένα σύνθετο σύστημα έκκρισης πρωτεϊνών, γνωστό ως σύστημα έκκρισης τύπου III, που απαιτούνται για την αποστολή σημάτων που αποσυντονίζουν

τα κύτταρα του ξενιστή και τελικά οδηγούν στην είσοδο των βακτηριακών κυττάρων. Τέτοια συστήματα υπάρχουν επίσης και σε διάφορους άλλους εντεροπαθογόνους μικροοργανισμούς όπως τα είδη *Shigella*, *Yersinia* και τα εντεροπαθογόνα και εντεροαιμορραγικά στελέχη *E. coli* (βλ. Παράγραφο 1.1.3.3. και 1.1.3.4.). Η σαλμονέλλα που έχει εισαχθεί με ενδοκύτωση περνά μέσα στα επιθηλιακά κύτταρα διαμέσου ενός συνδεδεμένου στη μεμβράνη χυμοτοπίου, όπου πολλαπλασιάζονται και απελευθερώνονται έπειτα στο μεμβρανώδες βλεννογόνο. Αυτό προκαλεί μια ροή φλεγμονωδών κυττάρων που οδηγούν στην απελευθέρωση προσταγλαδινών που ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση η οποία προκαλεί έκκριση ρευστών στον εντερικό αυλό. Η εικόνα είναι λίγο πιο σύνθετη αν αναλογιστεί κανείς ότι υπάρχουν τουλάχιστον άλλες τέσσερις περιοχές παθογένειας που συμβάλλουν κι αυτές στην όλη παθογένεια του μικροοργανισμού.

▪ **Συστηματική νόσος.** Οι ορότυποι *Salmonella* spp. που προσαρμόζονται ανάλογα με τον ξενιστή είναι πιο επιθετικοί και τείνουν να προκαλέσουν συστηματικές νόσους στους ξενιστές τους, ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα τους που συνδέεται με την ανθεκτικότητά τους στην καταπολέμηση από τα φαγοκύτταρα. Στους ανθρώπους, αυτό ισχύει για τους τυφοειδείς και παρατυφοειδείς βακίλους *S. typhi* και *S. paratyphi* A, B, και C, οι οποίοι προκαλούν σηψαιμικές ασθένειες και εντερικό πυρετό. Ο τυφοειδής πυρετός έχει μια περίοδο επώασης από 3 έως 56 ημέρες, αν και συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 10 και 20 ημερών. Ο επιτιθέμενος μικροοργανισμός *Salmonella* spp. διαπερνά το εντερικό επιθήλιο και έπειτα μεταφέρεται από τα λεμφικά κύτταρα στους μεσεντερικούς λεμφαδένες. Μετά από τον πολλαπλασιασμό του το παθογόνο στα μακρόφαγα, απελευθερώνεται στη ροή του αίματος και διαδίδεται σε ολόκληρο το σώμα. Αφαιρούνται από το αίμα και πάλι με χρήση των μακροφάγων αλλά συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται μέσα σε αυτά κάτι το οποίο έχει ως συνέπεια καταστροφή τελικά των μακροφάγων τα οποία απελευθερώνουν με τη σειρά τους μεγάλους αριθμούς βακτηρίων στη ροή του αίματος προκαλώντας σηψαιμία. Κατά τη διάρκεια του δεύτερου σταδίου της ασθένειας, ο μικροοργανισμός φθάνει στη χοληδόχο κύστη όπου πολλαπλασιάζεται στη χολή. Η ροή μολυσμένης χολής επαναμολύνει το λεπτό έντερο οπότε και προκαλείται φλεγμονή και έλκος. Ο πυρετός εμμένει με παράλληλη διάρροια κατά την οποία αποβάλλονται μεγάλες ποσότητες βακτηρίων. Σε σοβαρότερες περιπτώσεις, μπορεί να εμφανιστεί αιμορραγία των ελκών και διάτρηση του εντέρου που οδηγεί σε περιτονίτιδα. Σε ηπιότερες

περιπτώσεις, τα έλκη θεραπεύονται και ο πυρετος πέφτει σταδιακά μετά από 4-5 εβδομάδες ανάρρωσης.

Η μοριακή και γενετική βάση για την προσκόλληση και εισβολή του βακτηρίου *Salmonella* spp. εντός των κυττάρων των ξενιστών και η εν γένει παθογένειά της είναι και σύνθετη και ξεχωριστή. Τουλάχιστον 60 γονίδια είναι υπεύθυνα για τη λοιμοτοξικότητα του παθογόνου αυτού μικροοργανισμού (Groisman και Ochman, 1997). Αρκετά από αυτά τα γονίδια εδρεύουν ως οπερόνιο σε ένα μεγάλο πλασμίδιο κοινό για τους περισσότερους οροτύπους *Salmonella* spp. ενώ ακόμη ένας μεγάλος αριθμός βρίσκεται σε διάφορες περιοχές του χρωμοσώματος μέσα σε ζώνες παθογονικότητας (pathogenicity islands). Η ζώνη παθογονικότητας της οποίας η δράση έχει αναλυθεί περισσότερο είναι η **SPI-1**, μια περιοχή 40 kb που διαθέτει πάνω από 30 γονίδια και κωδικοποιεί δύο ρυθμιστικές πρωτεΐνες που επιτελούν διαφορετικούς ρόλους, την **InvF** και **HilA**. Επίσης κωδικοποιεί και τα στοιχεία του συστήματος έκκρισης τύπου III, που καλούνται **Inv/SPA** και είναι απαραίτητα για την προσβολή και τη λοιμοτοξικότητα που προκαλούν στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Μια δεύτερη ζώνη παθογένειας 40 kb, η **SPI-2**, έχει εντοπιστεί σε χρωμόσωμα στο στέλεχος *S. enterica* serovar Typhimurium (Ochman et al., 1996· Shea et al., 1996). Η ζώνη SPI-2 που ευθύνεται για την πρόκληση συστηματικών νοσημάτων (systemic disease), περιέχει τουλάχιστον 17 γονίδια που κωδικοποιούν ένα ρυθμιστικό σύστημα δύο στοιχείων και ένα σύστημα έκκρισης τύπου III που καλείται σύστημα **Spi/SsA**. Αυτά τα συστήματα ξεχωρίζουν από πλευράς δομής και λειτουργίας από το σύστημα SPI-1 Inv/Spa και το σύστημα έκκρισης τύπου III που είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία και τη λειτουργία των μαστιγίων σε άλλα βακτηριακά γένη. Μια ακόμα περιοχή 7.8 kb η οποία εντοπίζεται στο μεγάλο πλασμίδιο λοιμοτοξικότητας (large virulence plasmid) του βακτηρίου *Salmonella* spp. και κωδικοποιεί πέντε γονίδια **spvRABCD**, είναι επίσης υπεύθυνη για την λοιμοτοξικότητα που προκαλεί το παθογόνο.

1.5.4. Συσχετισμός με τα τρόφιμα

Η σαλμονέλλωση περιγράφεται ως μόλυνση προερχόμενη από τα ζώα δεδομένου ότι η σημαντικότερη αιτία της ασθένειας αυτής στον άνθρωπο είναι η επαφή με τα μολυσμένα ζώα ή τα προϊόντα τους. Ανεπαρκής ή απύσχα τελική θερμική επεξεργασία είναι οι πιο κοινοί παράγοντες που συμβάλλουν στην πρόκληση κρουσμάτων σαλμονέλλωσης και επιτρέπουν στο παθογόνο να αναπτυχθεί στα

τρόφιμα. Το κρέας, το γάλα, τα πουλερικά και τα αυγά είναι εν δυνάμει φορείς του βακτηρίου, οι οποίοι αν δεν δεχτούν την απαιτούμενη θερμική επεξεργασία επιτρέπουν στη σαλμονέλλα να επιζήσει και δύνανται να προκαλέσουν διαμείανση (διασταυρούμενη επιμόλυνση) άλλων τροφίμων που καταναλώνονται χωρίς περαιτέρω μαγείρεμα. Η διαμείανση μπορεί να εμφανιστεί μέσω της άμεσης επαφής ή έμμεσα μέσω του μολυσμένου εξοπλισμού και των εργαλείων της κουζίνας. Οι ανθρώπινοι φορείς είναι γενικά λιγότερο σημαντικοί από τα ζώα στη μετάδοση της σαλμονέλλας. Η ανθρώπινη μετάδοση μπορεί να παρουσιαστεί εάν τα μολυσμένα χέρια ενός χειριστή τροφίμων αγγίζουν τρόφιμα που καταναλώνονται στη συνέχεια χωρίς επαρκές μαγείρεμα. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται τα σημαντικά κρούσματα σαλμονελλώσεων που κατά καιρούς έχουν συμβεί.

Πίνακας 4. Κρούσματα σαλμονελλώσεων που έχουν κατα καιρούς συμβεί.

Έτος	Τρόφιμο	Κρούσματα	Χώρα
1984	Ζελές που σερβιρίστηκε σε πελάτες αεροπορικής εταιρείας	766	-
1985	Γάλα για μωρά σε μορφή σκόνης	Δ/Α	Αγγλία
1986-87	Προϊόντα από κρέας πουλερικών	≈ 18000	Αγγλία
1988-89	Προϊόντα με βάση ωμά αυγά (σπιτικές μαγιονέζες και παγωτά)	≈ 26000	Αγγλία & Ουαλία
1995-96	Προϊόντα με βάση ωμά αυγά (σπιτικές μαγιονέζες και παγωτά)	≈ 27000	Αγγλία & Ουαλία
1995-96	Πουλερικά, απαστερίωτο γάλα, σάντουιτς σολομού κ.α.	≈ 10000	Γερμανία

1.6. Επιβίωση του μικροοργανισμού *Salmonella* spp. υπό συνθήκες όξινης καταπόνησης

Η ομοιόσταση του εσωτερικού pH του κυττάρου του μικροοργανισμού *Salmonella* spp. όταν αυτός εκτίθεται σε ακραία όξινες τιμές pH, διατηρείται όταν ο μικροοργανισμός αρχικά υποστεί ήπια όξινη καταπόνηση. Αυτό επιτρέπει τη σύνθεση εκ μέρους του βακτηριακού κυττάρου πρωτεϊνών όξινης καταπόνησης (acid stress proteins) όταν βρεθεί αργότερα σε πολύ χαμηλές τιμές pH περιβάλλοντος, κάτι το οποίο θα ήταν ανέφικτο σε κύτταρα που δεν θα είχαν υποστεί αυτή την αρχική προσαρμογή και θα εκτίθονταν απεύθείας σε ακραία όξινες τιμές pH. Ένα από τα

συστήματα που συμβάλλουν στη διατήρηση της ανθεκτικότητας του μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε συνθήκες όξινης καταπόνησης είναι το σύστημα αποκαρβοξυλάσης της λυσίνης (lysine decarboxylase - **CadA**) το οποίο λειτουργεί σε συνδυασμό με ένα μεταφορέα λυσίνης:καδαβερίνης (**CadB**) (Park et al., 1996). Η CadA αποκαρβοξυλιώνει την ενδοκυτταρική λυσίνη προς καδαβερίνη, καταναλίσκοντας ένα πρωτόνιο. Η καδαβερίνη στη συνέχεια αποβάλλεται από το κύτταρο και ένα νέο μόριο λυσίνης εισάγεται από το εξωκυτταρικό περιβάλλον μέσω του μεταφορέα λυσίνης:καδαβερίνης. Η επαγωγή του οπερονίου **cadAB** από το όξινο περιβάλλον και τη λυσίνη προκαλεί αύξηση του ενδοκυτταρικού pH κατά 1 μονάδα στις ακραία όξινες συνθήκες του περιβάλλοντος, δίνοντας σαφέστατα ένα πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι των στελεχών που έχουν υποστεί μετάλλαξη των cad γονιδίων. Ο μικροοργανισμός *Salmonella* spp. μπορεί να επιζήσει πολλών διαφορετικών συνθηκών όξινης καταπόνησης, αφού η επιβίωσή του εξαρτάται από το ποιά αμινοξέα είναι διαθέσιμα στο περιβάλλον ανάπτυξης (λυσίνη, ορνιθίνη, αργινίνη) οπότε και θέτει σε «λειτουργία» το αντίστοιχο σύστημα επαγωγής οξεοανθεκτικότητας. Έχουν αναγνωριστεί τρεις ρυθμιστικές πρωτεΐνες, οι **RpoS**, **Fur** και **PhoP**, που ελέγχουν διάφορα συστήματα ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση και προκαλούν την έκφραση μιας ομάδας πρωτεϊνών σε αυτές τις συνθήκες. Ακόμη ο παράγοντας σίγμα, σ^S , που κωδικοποιείται από το rpoS και ρυθμίζει ένα μέρος της οξεοανθεκτικότητας της *Salmonella* spp. είναι γνωστό ότι αποτελεί ένα κρίσιμο ρυθμιστή της φυσιολογίας κατά την στατική φάση ανάπτυξης αλλά έχει αποδειχτεί η χρησιμότητά του και κατά την εκθετική φάση (Hengge-Aronis, 1996). Μετάλλαξη των γονιδίων που κωδικοποιούν τις ανωτέρω ρυθμιστικές πρωτεΐνες οδηγεί σε μείωση της ανθεκτικότητας του κυττάρου σε συνθήκες όξινης καταπόνησης, αποδεικνύοντας το σπουδαίο ρόλο που επιτελούν σ' αυτό τον τομέα.

1.7. Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Yersinia enterocolitica*

1.7.1 Εισαγωγή και ιστορικά στοιχεία

Η *Yersinia enterocolitica* είναι ένα από τρία είδη του γένους *Yersinia* που αναγνωρίζεται ως ανθρώπινο παθογόνο. Η *Y. enterocolitica* προκαλεί κυρίως γαστρεντερίτιδα, ενώ η *Y. pseudotuberculosis* συνδέεται κυρίως με τη μεσεντερική αδενίτιδα (mesenteric adenitis). Από άποψη κοινωνικού αντικτύπου κανένα από τα δύο στελέχη δε συγκρίνεται με τη *Yersinia pestis*, υπεύθυνη για τη βουβωνική πανούκλα που σκότωσε περίπου το ένα τέταρτο του ευρωπαϊκού πληθυσμού το 14^ο αιώνα. Το γένος *Yersinia* πήρε το όνομά του από το γάλλο βακτηριολόγο Alexandre Yersin ο οποίος το 1894, περιέγραψε αρχικά το μικροοργανισμό που ήταν υπεύθυνος για τη βουβωνική πανούκλα. Στο νέο όνομα του γένους ήρθαν να προστεθούν πρώην μέλη του γένους *Pasteurella* που ήταν σαφώς μέλη της οικογένειας *Enterobacteriaceae*. Το 1964, η σύγκριση του *Bacterium enterocoliticum* με έναν αριθμό απομονωμένων στελεχών στενά συνδεδεμένων με το πρώτο, οδήγησε τον Frederiksen να προτείνει τη δημιουργία του νέου είδους *Yersinia enterocolitica* ενώ εντός του γένους προστέθηκαν στη συνέχεια και άλλα επτά νέα είδη μη παθογόνων στελεχών. Τα στελέχη που απομονώνονται συνήθως από τα τρόφιμα είναι τα *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. mollaretii* και *Y. bercovierii* και μπορούν να διακριθούν εύκολα από το γένος *Y. enterocolitica* βάσει κάποιων βιοχημικών δοκιμών.

Η σπουδαιότητα του μικροοργανισμού *Y. enterocolitica* ως αιτίας τροφιμογενών ασθενειών ποικίλλει μεταξύ των χωρών. Στην Αγγλία και την Ουαλία, οι αναφορές για κρούσματα από *Y. enterocolitica*, συνήθως σποραδικές περιπτώσεις, αυξήθηκαν από 45 το 1980 σε 571 το 1989 οπότε και ξεπέρασε αριθμητικά τις περιπτώσεις προσβολής από *S. aureus* και *Bacillus* spp. Αυτό αποτέλεσε ακρότατο στις αναφορές τροφοδηλητηριάσεων από το συγκεκριμένο παθογόνο, οι οποίες μειώθηκαν έπειτα σ'ένα μέσο όρο 25 κρουσμάτων ετησίως εντός της περιόδου 2000-2005. Η γερσινίωση είναι περισσότερο διαδεδομένη στα πιο δροσερά κλίματα της βόρειας Ευρώπης, ιδιαίτερα στο Βέλγιο και στη Βόρεια Αμερική όπου έχουν αναφερθεί επιδημικές εξάρσεις τροφοδηλητηριάσεων. Ο μικροοργανισμός *Yersinia enterocolitica* επιδεικνύει επίσης μια διαφορετική εποχιακή παραλλαγή σε σχέση με τα περισσότερα παθογόνα που εμπλέκονται σε περιπτώσεις τροφιμογενών ασθενειών, αφού εμφανίζεται κατά κύριο λόγο το φθινόπωρο και το χειμώνα.

1.7.2. Ο μικροοργανισμός και τα χαρακτηριστικά του

Ο μικροοργανισμός *Y. enterocolitica* είναι μέλος της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, είναι μη σποριογόνος, μικρού μεγέθους (0.5-1.0 επί 1-2 μm) αρνητικός κατά Gram βάκιλλος (Εικόνα 9), προαιρετικά αναερόβιος, θετικός στην καταλάση και αρνητικός στην οξειδάση. Μπορεί να αναπτυχθεί σ'ένα ευρύ



Εικόνα 9. Φωτογραφία από ηλεκτρονικό σαρωτή που απεικονίζει τους βακίλλους του βακτηρίου *Yersinia enterocolitica*.
(www.wadsworth.org/databank/images/yersinia.gif)

θερμοκρασιακό φάσμα, από -1°C έως $+40^{\circ}\text{C}$, με βέλτιστη τιμή τους 29°C και έχει διάφορα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά εξαρτώμενα από τη θερμοκρασία. Παραδείγματος χάριν, παρουσιάζει κινητικότητα με χρήση περίτριχων μαστιγίων κάτω από τους 30°C , κάτι το οποίο δεν ισχύει στους 37°C . Όπως άλλα ψυχρότροφα βακτήρια έτσι κι ο μικροοργανισμός *Y. enterocolitica*, είναι ικανός να αναπτυχθεί σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες, με αποτέλεσμα να έχει βρεθεί ότι στους 3°C ο πληθυσμός αυξάνεται κατά δύο λογαριθμικούς κύκλους μέσα σε 4 ημέρες σε θρεπτικά μέσα. Είναι

θερμοευαίσθητος αλλά με ιδιαίτερη παραλλακτικότητα μεταξύ των διαφόρων στελεχών. Βέλτιστη ανάπτυξη εμφανίζεται σ'ένα εύρος pH 7-8 με ελάχιστη τιμή από 5.1 έως 4.1 ανάλογα με το μέσο οξίνισης που χρησιμοποιείται. Μείωση της θερμοκρασίας συνεπάγεται αύξηση της ελάχιστης τιμής pH στην οποία το βακτήριο *Y. enterocolitica* αναπτύσσεται. Η ανάπτυξη είναι δυνατή σε θρεπτικά υποστρώματα που περιέχουν 5% αλάτι αλλά όχι σ'αυτά με 7%, στους 3°C ή στους 25°C .

Ο μικροοργανισμός *Y. enterocolitica* δύναται να απομονωθεί από μια πληθώρα περιβαλλοντικών πηγών συμπεριλαμβανομένου του χώματος, του γλυκού νερού και του εντερικού συστήματος πολλών ζώων. Οι έρευνες έχουν εντοπίσει το μικροοργανισμό σε πολυάριθμα τρόφιμα συμπεριλαμβανομένου του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων, των κρεάτων και ιδιαίτερα του χοιρινού κρέατος,

των πουλερικών, των ψαριών και των οστρακόδερμων, των φρούτων και των λαχανικών. Τα περισσότερα βέβαια στελέχη που έχουν απομονωθεί σε τρόφιμα είναι μη παθογόνα και γνωστά ως περιβαλλοντικά στελέχη. Η παθογένεια εμφανίζεται να συνδέεται μόνο με ορισμένους τύπους, κάθε ένας με μια ιδιαίτερη γεωγραφική κατανομή (Πίνακας 5). Στην Ευρώπη, τον Καναδά, την Ιαπωνία και τη Νότιο Αφρική η γερσινίωση στον άνθρωπο προκαλείται πολύ συχνά από το βιότυπο 4, ορότυπο O:3 (4/O3) και σε μικρότερη έκταση στην Ευρώπη και την Ιαπωνία και από τον βιο-ορότυπο 2/O:9. Στις Ηνωμένες Πολιτείες ο βιο-ορότυπος 1/O:8 είναι αυτός που συνηθέστερα προκαλεί την ανθρώπινη γερσινίωση. Μέχρι σήμερα, τουλάχιστον 30 διαφορετικοί O-αντιγονικοί λιποπολυσακχαρίτες έχουν προσδιοριστεί στο μικροοργανισμό *Y. enterocolitica*.

Πίνακας 5. Σχέση μεταξύ του βιο-οροτύπου του μικροοργανισμού *Y. enterocolitica*, του ξενιστή και της γεωγραφικής κατανομής (πηγή: Adams M.R. & Moss M.O., Food Microbiology 3rd edition, 2007).

Βιότυπος	Ορότυπος	Ξενιστής	Σύνδρομο	Χώρα
1	O:8	Άνθρωπος	Γαστρεντερίτιδα	ΗΠΑ, Καναδάς
2	O:9	Άνθρωπος Χοίροι	Γαστρεντερίτιδα Υγιείς	Ευρώπη, Ιαπωνία Ευρώπη, Ιαπωνία
3	O:1	Τσιντσιλά	Συστηματική νόσος	Ευρώπη
4	O:3	Άνθρωπος Χοίροι	Γαστρεντερίτιδα Υγιείς	Ευρώπη, Ιαπωνία, Νότιος Αφρική, Καναδάς Ευρώπη, Ιαπωνία, Νότιος Αφρική, Καναδάς
5	O:2	Αίγες	Θάνατος	Ευρώπη

1.7.3. Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά

Η ασθένεια που προκαλείται από το μικροοργανισμό *Y. enterocolitica* εμφανίζεται συνηθέστερα στα παιδιά κάτω των επτά ετών. Είναι εντεροκολίτιδα που περιορίζεται μόνη της με την πάροδο του χρόνου, με περίοδο επώασης από 1 έως 11 ημέρες και διάρκεια μεταξύ 5 και 14 ημερών, αν και σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να εμμείνει για αρκετά περισσότερο. Τα συμπτώματα είναι κυρίως κοιλιακοί πόνοι και διάρροια που συνοδεύονται από ήπιο πυρετό, ενώ ο εμετός είναι σπάνιος. Μερικές φορές ο πόνος ο οποίος είναι αποτέλεσμα οξείας τελικής ιλεΐτιδας και μεσεντερικής λεμφαδενίτιδας (φλεγμονή των μεσεντερικών λεμφαδένων), είναι περιορισμένος

χαμηλά στη δεξιά πλευρά του σώματος και εσφαλμένα γίνεται διάγνωση για σκωληκοειδίτιδα και κατ'επέκταση χειρουργική επέμβαση. Μπορεί επίσης να εμφανιστούν στους ενηλίκους και ιδιαίτερα στις γυναίκες επιπλοκές μετά τη μόλυνση όπως το οζώδες ερύθημα (erythema nodosum) και η αρθρίτιδα οι οποίες συνδέονται κυρίως με τους ορότυπους O:3 και O:9 και είναι επομένως πιο κοινές στην Ευρώπη (Πίνακας 5). Κύτταρα του παθογόνου *Y. enterocolitica* που επιζούν της μετάβασης μέσω του όξινου pH του στομάχου προσκολλώνται στο βλεννογόνο των πλακών του Peyer (λεμφικός ιστός εντέρου). Η προσκόλληση υποβοηθείται από τις πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου που κωδικοποιούνται από ένα πλασμίδιο 40-48 MDa που το διαθέτουν όλα τα παθογόνα στελέχη *Y. enterocolitica*. Το πλασμίδιο είναι ουσιαστικό αλλά όχι η μόνη προϋπόθεση για την πρόκληση λοιμοτοξικότητας δεδομένου ότι η εισβολή στα κύτταρα ελέγχεται και από χρωμοσωμικά γονίδια. Το προσκολλημένο βακτηριακό κύτταρο εισάγεται εντός του επιθηλιακού κυττάρου με ενδοκύτωση όπου επιζεί χωρίς να πολλαπλασιάζεται σημαντικά και μπορεί να ασκήσει κυτταροτοξική δραστηριότητα. Απελευθερούμενο στη βλεννογόνο μεμβράνη, εισβάλλει στα φαγοκυτταρικά κύτταρα και πολλαπλασιάζεται εξοκυτταρικά δημιουργώντας φλεγμονώδη αντίδραση. Ο μικροοργανισμός *Y. enterocolitica* παράγει μια ανθεκτική στη θέρμανση εντεροτοξίνη (μοριακό βάρος 9000-9700 Da) αλλά ο ρόλος της στην παθογένεια είναι ακόμα, ασαφής. Φέρει όμως κάποια ομοιότητα με την ανθεκτική στη θέρμανση τοξίνη του βακτηρίου *E. coli* από ανοσολογικής απόψεως αλλά και στη δυνατότητά της να προκαλεί συσσώρευση υγρού στους ενωμένους ιλεϊκούς βρόχους αλλά και να υποκινεί τη δράση της γουανυλικής κυκλάσης. Έχει παρουσιαστεί παραγωγή τοξίνης σε εμβολιασμένα τρόφιμα, παρόλο που η παρατηρηθείσα περίοδος επώασης δε συνάδει με μια τροφοτοξίνωση. Τέλος, η ικανότητα παραγωγής τοξίνης δεν περιορίζεται στο παθογόνο στέλεχος *Y. enterocolitica*, αλλά έχει βρεθεί επίσης και σε πολυάριθμα περιβαλλοντικά στελέχη του είδους *Yersinia*.

1.7.4. Συσχετισμός με τα τρόφιμα

Οι χοίροι αναγνωρίζονται ως χρόνιοι φορείς εκείνων των οροτύπων *Y. enterocolitica* που εμπλέκονται συνηθέστερα στις ανθρώπινες προσβολές (O:3, O:5, 27, O:8, O:9). Παρ'αυτά, το χοιρινό κρέας μόνο περιστασιακά έχει αποδειχθεί ότι είναι υπαίτιος γερσινίωσης, αν και στο Βέλγιο, που έχει την υψηλότερη συχνότητα γερσινιώσεων, η κατανάλωση ανεπαρκώς επεξεργασμένου χοιρινού κρέατος

προκάλεσε επιδημική έξαρση τροφιμογενούς μόλυνσης. Το 1988-89 θύματα γερσινίωσης στην Ατλάντα των ΗΠΑ ήταν 15 άτομα εκ των οποίων τα 14 παιδιά και το περιστατικό συνδέθηκε με την οικιακή παραγωγή ανεπαρκώς επεξεργασμένων τεμαχίων χοιρινού κρέατος. Κρούσματα γερσινίωσης έχουν αναφερθεί και από μολυσμένο γάλα, συμπεριλαμβανομένου του μεγαλύτερου που καταγράφεται έως τώρα και το οποίο εμφανίστηκε το 1982 στο Τενεσύ, στο Αρκάνσας και στο Μισισιπή των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής. Σε αυτήν την περίπτωση οι χοίροι αναφέρθηκαν ως αρχική πηγή μόλυνσης, αλλά αποδείχθηκε ότι δεν ήταν φορείς του ίδιου ορότυπου O:13 που προκάλεσε τη μόλυνση. Θεωρήθηκε ότι ο μικροοργανισμός «πέρασε» από τους χοίρους, μέσω της λάσπης, επάνω σε δοχεία μεταφοράς αποβλήτων γάλακτος κατά τη μεταφορά τους από το χώρο συλλογής του προϊόντος στο χώρο φύλαξης των χοίρων. Τα δοχεία επεστράφησαν στο γαλακτοκομείο, πλύθηκαν και αποστειρώθηκαν ανεπαρκώς πριν την επαναχρησιμοποίησή τους προκειμένου να μεταφέρει και πάλι φρέσκο γάλα. Κατά συνέπεια το εξωτερικό μέρος των δοχείων μολύνθηκε με το βακτήριο *Y. enterocolitica* το οποίο στη συνέχεια μεταφέρθηκε στο γάλα με τις μετέπειτα μεταχειρίσεις του. Στη συνέχεια καταδείχθηκε ότι ο μικροοργανισμός ήταν ικανός να επιζήσει για τουλάχιστον 21 ημέρες έξω από τα χαρτοκιβώτια γάλακτος που διατηρούνταν στους 4°C. Το μολυσμένο νερό που χρησιμοποιήθηκε στην επεξεργασία των καρπών σόγιας και στη συσκευασία του πολτού που προέκυψε από αυτούς ήταν υπεύθυνο για μια σειρά κρουσμάτων στις Ηνωμένες Πολιτείες το 1982. Διάφορες προσεγγίσεις στον έλεγχο της γερσινίωσης έχουν προταθεί κατά καιρούς που είναι γενικά παρόμοιες με εκείνες που προτείνονται για τον έλεγχο άλλων προσβολών που προέρχονται από τα ζώα (zoonotic infections) όπως η σαλμονέλλωση. Μελέτες στη Δανία σχετικά με τη μόλυνση προϊόντων χοιρινού κρέατος από *Y. enterocolitica* έχουν αναγνωρίσει τον εκσπλαχνισμό και τις τομές που γίνονται κατά τη διάρκεια της επιθεώρησης των κρεάτων ως κρίσιμα σημεία ελέγχου και έχουν δείξει περαιτέρω ότι η αποκοπή της γλώσσας και των αμυγδαλών ως χωριστή διαδικασία μειώνει σημαντικά τη μόλυνση άλλων εσωτερικών οργάνων του σφαγίου.

1.8. Επιβίωση του μικροοργανισμού *Yersinia enterocolitica* υπό συνθήκες όξινης καταπόνησης

Ο μικροοργανισμός *Yersinia enterocolitica* είναι ένα εντερικό παθογόνο που αποκτά πρόσβαση στο σώμα από τη στοματική οδό μετά από κατάποση μολυσμένων τροφίμων ή νερού. Το παθογόνο βακτήριο περνά από το στομάχι πριν αποικίσει και διαπεράσει το εντερικό βλεννογόνο και προκαλέσει ένα ευρύ φάσμα κλινικών διαταραχών. Αν και η *Y. enterocolitica* έχει βέλτιστο pH ανάπτυξης από 7.0 έως 8.0, είναι σε θέση να αναπτυχθεί και σε ένα ευρύτερο όριο 5.0 έως 9.0 και παραμένει βιώσιμη ακόμα και μετά από 48 ώρες σε pH 4.4 (Stern et al., 1980). Επιπλέον, η δυνατότητα ορισμένων στελεχών *Y. enterocolitica* να επιζούν σε περιβάλλον υψηλής οξύτητας σε μερικά τρόφιμα δείχνει ότι αυτά τα παθογόνα βακτήρια είναι σχετικά οξεοανθεκτικά. Ο μηχανισμός της ανθεκτικότητας σε συνθήκες όξινης καταπόνησης για το μικροοργανισμό *Y. enterocolitica* είναι άγνωστος, αλλά πιθανότατα οφείλεται στη δράση της **ουρεάσης**. Αυτό το ένζυμο καταλύει την υδρόλυση της ουρίας προς σχηματισμό διοξειδίου του άνθρακα και αμμωνίας, που οδηγεί σε αύξηση της τιμής του pH ενδοκυτταρικά. Η δραστηριότητα της ουρεάσης μπορεί να συμβάλει στη λοιμοτοξικότητα του βακτηρίου *Y. enterocolitica* αφού επάγει την ανθεκτικότητα στην όξινη καταπόνηση και με αυτό τον τρόπο ενισχύει την πιθανότητα επιβίωσης στο στομάχι και άλλα όξινα περιβάλλοντα που το παθογόνο συναντά κατά την είσοδο του στον οργανισμό (De Koning-Ward και Robins-Browne, 1995). Έχει βρεθεί ότι η αντοχή του μικροοργανισμού *Y. enterocolitica* σε χαμηλές τιμές pH εξαρτάται από την περιβαλλοντική θερμοκρασία, τη σύνθεση του μέσου ανάπτυξης, το οξύ που χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση του pH και τη φάση ανάπτυξης, με τη μέγιστη ανθεκτικότητα να εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της στατικής φάσης (De Koning-Ward και Robins-Browne, 1995· Young et al., 1996). Αυτά τα συμπεράσματα είναι παρόμοια με εκείνα που ελήφθησαν όταν το είδος *Shigella* spp. υπέστη όξινη καταπόνηση (Gorden και Small., 1993). Παρόλ'αυτά, σε αντίθεση με τα είδη οξεοανθεκτικών εντεροβακτηρίων *Shigella* spp., *Salmonella* spp. και *E. Coli*, στη *Y. enterocolitica* παρατηρήθηκε οξεοανθεκτικότητα μόνο παρουσία ουρίας, που υποδηλώνει ότι η δράση της ουρεάσης ήταν αρμόδια για αυτήν την ιδιότητα του μικροοργανισμού. Ο μικροοργανισμός *Shigella flexneri* παραδείγματος χάριν, δεν παράγει ουρεάση, οπότε η έκφραση της ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση σε αυτό το είδος αλλά και στην *E. coli* εξαρτάται από ένα λειτουργικό παράγοντα σίγμα

αποκαλούμενο **rpoS**. Αδρανοποίηση του παράγοντα rpoS σε αυτά τα βακτήρια, τα καθιστά ιδιαίτερα ευαίσθητα σε όξινο περιβάλλον (Small, 1994), όπως ακριβώς ευαισθησία παρουσιάζουν και τα στελέχη *Y. enterocolitica* των οποίων το γονίδιο κωδικοποίησης της ουρεάσης έχει υποστεί μετάλλαξη. Αν και ο μικροοργανισμός *Y. enterocolitica* φέρει επίσης ένα γονίδιο rpoS (Iriarte et al., 1995), το πως αυτό επηρεάζει την αντοχή του μικροοργανισμού στην όξινη καταπόνηση δεν είναι γνωστό. Η προφανής όμως ευαισθησία στην όξινη καταπόνηση, που παρουσιάζουν τα στελέχη *Y. enterocolitica* που έχουν υποστεί μετάλλαξη του γονιδίου που κωδικοποιεί την παραγωγή ουρεάσης, υποδηλώνει ότι αυτή είναι ο σημαντικότερος παράγοντας που συνεισφέρει στην ανθεκτικότητα αυτού του είδους.

1.9. Πρωτεομική (Proteomics)

Η πρωτεομική είναι η μεγάλης κλίμακας μελέτη των πρωτεϊνών, ιδιαίτερα της δομής και λειτουργίας τους (Anderson και Anderson, 1998· Blackstock και Weir, 1999). Οι πρωτεΐνες είναι ζωτικής σημασίας συστατικά των ζωντανών οργανισμών, αφού είναι τα κύρια συστατικά των φυσιολογικών μεταβολικών μονοπατιών των κυττάρων. Ο όρος «proteomics» παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 1997 (James, 1997) ως ανάλογος του όρου genomics, της μελέτης δηλαδή των γονιδίων. Η λέξη «πρωτέωμα» είναι μια μίξη των λέξεων «πρωτεΐνης» και «γονιδίωμα», και κατασκευάστηκε από τον καθηγητή Marc Wilkins το 1994. Το πρωτέωμα είναι ολόκληρο το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών που παράγεται από έναν οργανισμό ή ένα σύστημα (Wilkins et al., 1996), συμπεριλαμβανομένων των χωροχρονικών τροποποιήσεων και μεταβολών που επισυμβαίνουν σε αυτό. Το πρωτέωμα δηλαδή ποικίλει με το χρόνο και τις καταπονήσεις στις οποίες υποβάλλεται ένα κύτταρο ή ένας οργανισμός. Μετά από τα genomics, τα proteomics θεωρούνται συχνά το επόμενο βήμα στη μελέτη των βιολογικών συστημάτων. Αυτή η μελέτη είναι πιο περίπλοκη από των genomics, επειδή το γονιδίωμα ενός οργανισμού είναι λίγο έως πολύ σταθερό, ενώ το πρωτέωμα διαφέρει από κύτταρο σε κύτταρο και ανάλογα με τις χρονικές περιόδους. Αυτό σημαίνει ότι ακόμη και ένα βασικό σύνολο πρωτεϊνών που εκφράζεται σε ένα κύτταρο πρέπει να καθοριστεί. Στο παρελθόν αυτό γινόταν από την ανάλυση του mRNA, αλλά βρέθηκε ότι κατ'αυτό τον τρόπο δεν υπάρχει συσχέτιση με την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (Simon et al., 2008· Dhingraa et al., 2005). Τώρα πλέον είναι γνωστό ότι το mRNA δεν μεταφράζεται πάντα σε πρωτεΐνη

(Buckingham, 2003) και η ποσότητα πρωτεΐνης που παράγεται από ένα δεδομένο αριθμό mRNA εξαρτάται από το γονίδιο από το οποίο μεταγράφεται και από την τρέχουσα φυσιολογική κατάσταση του κυττάρου. Η πρωτεομική επιβεβαιώνει την παρουσία της πρωτεΐνης και παρέχει ένα άμεσο μέτρο της ποσότητας που έχει ανευρεθεί.

Το ενδιαφέρον των επιστημόνων για τα proteomics είναι τεράστιο λόγω του ότι παρέχει καλύτερη κατανόηση ενός οργανισμού από τα genomics. Πρώτον, το επίπεδο μεταγραφής ενός γονιδίου δίνει μόνο μια κατά προσέγγιση εκτίμηση του επιπέδου έκφρασής του σε πρωτεΐνη. Ένα mRNA που παράγεται σε αφθονία μπορεί να αλλοιωθεί γρήγορα ή να μεταφραστεί ανεπαρκώς, με συνέπεια παραγωγή μικρών ποσοτήτων μιας πρωτεΐνης. Δεύτερον, πολλές πρωτεΐνες υφίστανται τροποποιήσεις μετά τη μετάφραση που έχουν προφανείς επιπτώσεις στη δραστηριότητά τους. Παραδείγματος χάριν μερικές πρωτεΐνες δεν είναι ενεργές έως ότου φωσφορυλιωθούν. Έτσι μέθοδοι όπως τα phosphoproteomics και glycoproteomics χρησιμοποιούνται στη μελέτη «μετα-μεταφραστικών» τροποποιήσεων. Τρίτον, η μεταγραφή δύναται να δώσει περισσότερες από μια πρωτεΐνες, μέσω εναλλακτικών συνδέσεων (alternative splicing) ή των εναλλακτικών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Τέταρτον, πολλές πρωτεΐνες διαμορφώνουν σύμπλοκα με άλλες πρωτεΐνες ή μόρια RNA και λειτουργούν μόνο παρουσία αυτών των μορίων. Τέλος, ο ρυθμός υποβάθμιση του πρωτεϊνικού περιεχομένου διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στην περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (Belle et al., 2006). Ένας τρόπος βάσει του οποίου μπορεί να μελετηθεί μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι η ανάπτυξη ενός αντισώματος που είναι εξειδικευμένο για εκείνη την πρωτεΐνη. Παραδείγματος χάριν, υπάρχουν αντισώματα που αναγνωρίζουν μόνο ορισμένες πρωτεΐνες όταν εκείνες είναι φωσφορυλιωμένες με τυροσίνη. Αυτά λοιπόν τα αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να καθορίσουν το σύνολο των πρωτεϊνών που έχουν υποβληθεί σε μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Έχει παραδείγματος χάριν βρεθεί ότι η γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών, προκαλείται από κάποιες λεκτίνες οι οποίες δεσμεύουν τα σάκχαρα. Ένας πίο κοινός τρόπος να καθορισθεί η μετα-μεταφραστική τροποποίηση μιας πρωτεΐνης είναι με την υποβολή ενός σύνθετου μίγματος πρωτεϊνών σε ηλεκτροφόρηση «δύο-διαστάσεων», το οποίο απλά σημαίνει ότι οι πρωτεΐνες ηλεκτροφορούνται πρώτα κατά μια διάσταση (π.χ. κατά ισοηλεκτρικό σημείο) και έπειτα κατά την άλλη (π.χ. κατά μοριακό βάρος), μέσω ενός διαδοχικού συνδυασμού ισοηλεκτρικού εστιασμού (isoelectric focusing, IEF) και

ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμιδίου-δωδεκυλοθειικού νατρίου (sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), που επιτρέπει την απεικόνιση των μικρών διαφορών που εντοπίζονται σε μια πρωτεΐνη πραγματοποιώντας διαχωρισμό της τροποποιημένης μορφής της από τη μη τροποποιημένη. Στις μέρες μας, η τεχνική 2D SDS-PAGE παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην πρωτεομική έρευνα που αφορά στην επιστήμη και τεχνολογία των τροφίμων αν και πρόσφατα, μια άλλη προσέγγιση έχει αναπτυχθεί και η οποία ονομάζεται PROTOMAP και συνδυάζει την SDS-PAGE με το λεγόμενο shotgun proteomics που χρησιμοποιεί ένα συνδυασμό υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) και φασματομετρίας μάζας (mass spectrometry) (Hu et al., 2007· Fournier et al., 2007· Nesvizhskii, 2007).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Αναλώσιμα υλικά

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας και τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε μια πληθώρα υλικών εκ των οποίων ανόργανα και οργανικά χημικά αντιδραστήρια αλλά και τυποποιημένα σκευάσματα θρεπτικών υποστρωμάτων.

2.1.1. Ανόργανα και οργανικά χημικά αντιδραστήρια

Από πλευράς ανόργανων χημικών αντιδραστηρίων χρησιμοποιήθηκε το χλωριούχο νάτριο (sodium chloride) (SDS , Peypin, France), το όξινο φωσφορικό κάλιο (dipotassium hydrogen phosphate) (MERCK, Darmstadt, Germany), το ένυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο (monosodium dihydrogen phosphate) (MERCK, Darmstadt, Germany) και το διϋδρικό όξινο φωσφορικό νάτριο (disodium hydrogen phosphate) (MERCK, Darmstadt, Germany). Από οργανικά χημικά αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν τα:

1. αγαρόζη χαμηλού σ.τ. (certified low melt agarose) (BIO-RAD 161-3111, Milan, Italy)
2. ακετόνη (acetone) (LAB-SCAN, A01C11X)
3. ακρυλαμίδιο (acrylamide) (SERVA 10675)
4. αλβουμίνη και συγκεκριμένα το κλάσμα V αυτής (albumin fraction V) (APPLICHEM A 1391,0025, Darmstadt, Germany)
5. αμφολύτες Bio-Lyte 3/10 (BIO-RAD 163-2094)
6. γλυκερόλη (glycerol) (SERVA 231176)
7. γλυκίνη (glycine) (SERVA 23390)
8. δείκτης μοριακών βαρών (size marker) Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range (BIO-RAD 161-0318)
9. διθειοθρεϊτόλη (dithiothreitol, DTT) (APPLICHEM A 1666,0025)
10. δωδεκυλοθειικό νάτριο (sodium dodecyl sulfate, SDS) (SIGMA L4390, St. Louis, USA)
11. DL-γαλακτικό οξύ (DL-lactic acid) (SIGMA L1250), με περιεκτικότητα 85% (w/w)
12. ιωδοακεταμίδιο (iodoacetamide) (Appllichem A 1666,0025)
13. *N,N'*μεθυλενο-bis-ακρυλαμίδιο (*N,N'*-methylenebisacrylamide)(SERVA 29195)

14. *N,N,N',N'*-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη(*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine, TEMED) (SERVA 35925)
15. μπλε βρωμοφαινόλης (bromophenol blue) (APPLICHEM A 2331,0005)
16. οξικό οξύ (acetic acid) 100% (Merck, Darmstadt, Germany)
17. ορυκτό έλαιο (mineral oil) (BIO-RAD 163-2129)
18. ουρία (urea) (APPLICHEM A 1049,1000)
19. τριυδροξυμεθυλοαμινομεθάνιο (trishydroxymethylaminomethane ή tris-base) (SERVA 37180)
20. τριχλωροξικό οξύ (trichloroacetic acid, TCA) (APPLICHEM A 1431,0250)
21. 3-[(3-χολαμιδοπροπυλ)διμεθυλαμμωνιο]-1-προπανοσουλφονικό οξύ (APPLICHEM A 4011,0005)
22. χρωστική Bio-Safe Coomassie (G250 stain) (BIO-RAD 161-0786)

2.1.2. Θρεπτικά υποστρώματα

Ως θρεπτικό υλικό σε όλη την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε το στερεό σε μορφή σκόνης υπόστρωμα Brain Heart Infusion (BHI) Broth (Biolife) του οποίου το pH και η ενεργότητα νερού (a_w) σε υδατικό διάλυμα ρυθμίζονταν με γαλακτικό ή οξικό οξύ και χλωριούχο νάτριο αντίστοιχα, προκειμένου να επιτευχθεί ο επιθυμητός συνδυασμός αυτών των δύο περιοριστικών για την αύξηση εμποδίων. Από την άλλη μεριά τα θρεπτικά συστατικά που κατά περιπτώσεις χρησιμοποιούνταν ήταν κατά βάση οργανικές μορφές του αζώτου απομονωμένες από θρεπτικά μέσα. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η τρυπτόνη (tryptone – pancreatic digest of casein) (Biolife, Milan, Italy) η οποία είναι πεπτίδιο σχηματιζόμενο από την πέψη της καζεΐνης του γάλακτος από το ένζυμο θρυψίνη. Η πεπτόνη σόγιας (soy peptone) (Biolife) που προέρχεται από την πρωτεολυτική διάσπαση της πρωτεϊνούχου σόγιας και το εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract) (Biolife) είναι δύο ακόμα από τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν.

2.2. Εργαστηριακός εξοπλισμός

Η εργαστηριακή υποδομή που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας περιελάμβανε τα σκεύη, όργανα και συσκευές που αναφέρονται παρακάτω:

A) Σκεύη:

1. γυάλινες φιάλες duran
2. γυάλινα φιαλίδια universal
3. δοκιμαστικοί σωλήνες
4. κωνικές φιάλες
5. λαβίδες
6. λύχνος Bunsen
7. μαγνήτες αναδέυσεως (διαφόρων μεγεθών)
8. μικροβιολογικός κρίκος
9. ογκομετρικοί κύλινδροι
10. πλαστικοί περιέκτες erpendorf (χωρητικότητας 1,5 ml)
11. πλαστικοί περιέκτες falcon (χωρητικότητας 15 ml)
12. πλαστικοί περιέκτες μέτρησης ενεργότητας νερού (a_w) (rotronic plates)
13. πλαστικά Microplates 96 οπών (PS Microplate 96 well) (greiner bio-one)
14. ποτήρια ζέσεως
15. ρύγγη (tips) των 100 και 1000 μ l για τις πιπέττες μεταβλητού όγκου και
16. στατό δοκιμαστικών σωλήνων
17. τρυβλία Petri (Sarstedt)

B) Συσκευές και όργανα:

Όπως αναφέρονται στον κατωτέρω Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Χρησιμοποιηθέντα όργανα ή συσκευές

A/A	Όργανο ή συσκευή	Μοντέλο	Εταιρεία
1	Ανακινούμενη επωαστική τράπεζα	KS 130 Basic	IKA
2	Αναλυτικοί ζυγοί	Mark (0,01 g) BP 3105 (0,001 g)	BEL ENGINEERING Sartorius
3	Επωαστικοί θάλαμοι	BE 500	Memmert
4	Έτοιμες βαθμιδώσεις pH 4-7 υπό μορφή λωρίδας (Ready IPG strips)	L 1632015	BIO-RAD

5	Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής	NU-425-400E	NuAire
6	Κλίβανος αποστείρωσης	OT 4060	nüve
7	Μετρητής ενεργότητας νερού (a_w)	HYGROLAB	Rotronic
8	Πεχάμετρο	pH 526	WTW
9	Πιπέττες μεταβλητού όγκου	Labopette (20-200 μ l) (100-1000 μ l)	HIRSCHMANN LABORGERÄTE
10	Συσκευή ανάμιξης	K-550-GE	Vortex-GENIE
11	Συσκευή ανάδευσης με θέρμανση	ARE	VELP Scientifica
12	Συσκευή ισοηλεκτρικού εστιασμού	Protean IEF cell	BIO-RAD
13	Συσκευή ηλεκτροφόρησης	Protean II	BIO-RAD
14	Συσκευή τροφοδοσίας συνεχούς ρεύματος ηλεκτροφόρησης	Power Pac 1000	BIO-RAD
15	Συσκευή σάρωσης-μέτρησης οπτικής πυκνότητας πηκτών ηλεκτροφόρησης	GS-800	BIO-RAD
16	Συσκευή υπερήχων	UP50H	hielscher
17	Υδατόλουτρο	WB 14	Memmert
18	Φυγόκεντροι	Megafuge 1.0 R Mini Spin Eppendorf	Heraeus instruments Milian
19	Φωτόμετρα	6100 Spectrophotometer Sunrise Remote	JENIWAY TECAN

2.3. Μικροβιακά στελέχη

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συμπεριφορά τεσσάρων παθογόνων μικροοργανισμών υπό συγκεκριμένες συνθήκες εμποδίων και καταπόνησης. Τα μελετηθέντα στελέχη **i)** *Escherichia coli* ATCC 25922 **ii)** *Listeria monocytogenes* LQC 15015 **iii)** *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 και **iv)** *Yersinia enterocolitica* CITY 650 προέρχονται από συλλογή απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών που διατηρεί το Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων. Οι μικροοργανισμοί συντηρούνται στους -20°C σε Nutrient broth, παρουσία γλυκερόλης σε ποσοστό 50% του συνολικού όγκου.

2.4. Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε και οι μικροβιακοί χειρισμοί που διενεργήθηκαν – σε κάθε περίπτωση υπό ασηπτικές συνθήκες – παρουσιάζονται στα ακόλουθα διαγράμματα ροής (Σχήματα 1 και 2) ενώ για λόγους καθαρά επαναληψιμότητας πραγματοποιείται πάντα διπλή επανάληψη (τουλάχιστον) του όλου πειράματος.

2.4.1. Ανανέωση των μικροοργανισμών

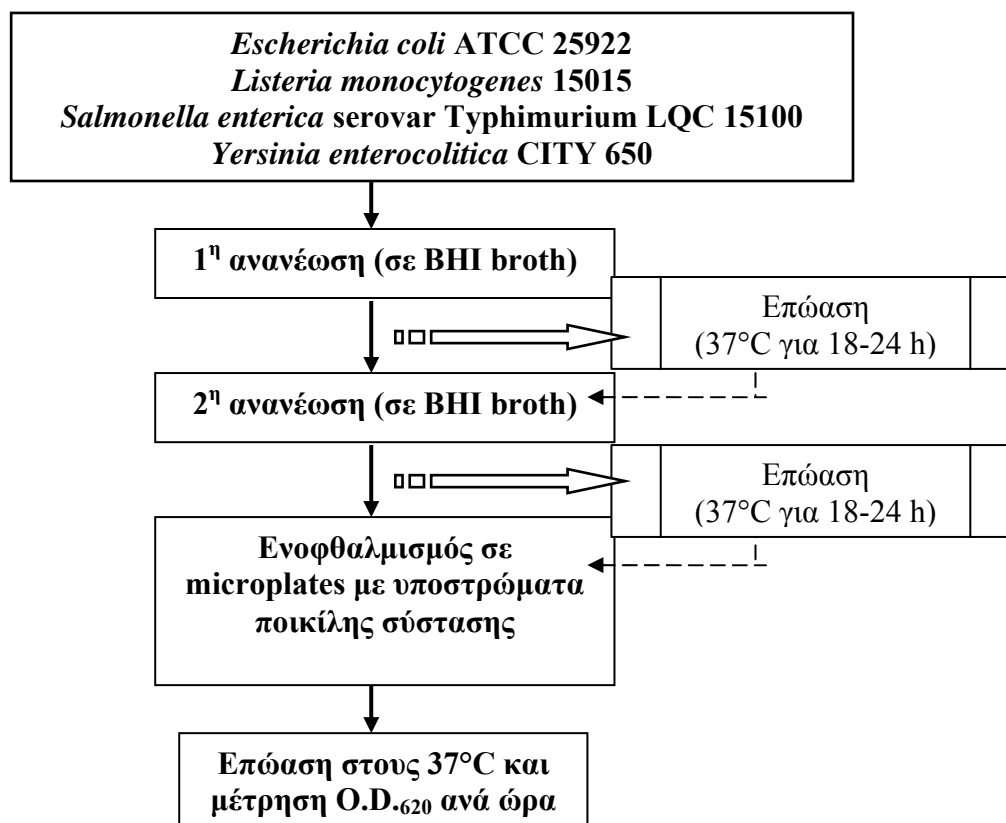
Πρόκειται για το στάδιο εκείνο το οποίο μεσολαβεί πριν από τον ενοφθαλμισμό των μικροοργανισμών σε κάποιο υπόστρωμα, προκειμένου να ανακτήσουν τη ζωτικότητα τους και να καταστούν άμεσα έτοιμοι για ανάπτυξη. Η ανανέωση διαρκεί 18 - 24 ώρες οπότε και οι μικροοργανισμοί τοποθετούνται σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα BHI broth με ακόλουθη επώαση σε θερμοκρασία 37°C. Πριν τον ενοφθαλμισμό γίνονται πάντα δύο ανανεώσεις προς επίτευξη των καλύτερων δυνατών αποτελεσμάτων από πλευράς ζωτικότητας. Στην περίπτωση τώρα και των τεσσάρων εξεταζόμενων στελεχών πραγματοποιούνταν όπως ήδη ειπώθηκε δύο ανανεώσεις, με εισαγωγή ποσότητας ενοφθαλμίσματος σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν περίπου 10 ml BHI broth και ακολουθούσε σε κάθε περίπτωση επώαση στους 37°C για 18 - 24 ώρες (βλ. Σχήμα 1).

Οι ίδιες συνθήκες (θερμοκρασία, χρόνος) ανανέωσης επικρατούσαν και στην περίπτωση της όξινης καταπόνησης (acid stress adaptation) των τεσσάρων μικροοργανισμών με τη μόνη διαφορά ότι το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα ήταν Tryptone Soy Broth (TSB), ένα υπόστρωμα που παρασκευάστηκε από τα μεμονωμένα υλικά τα οποία το αποτελούσαν, παραλείποντας όμως τη γλυκόζη και προσθέτοντας επιπλέον 0,6% Yeast Extract (YE), δίνοντας έτσι TSBYE. Στο προκύπτον θρεπτικό υπόστρωμα γινόταν ρύθμιση του pH – με γαλακτικό οξύ 85% (w/w) – στην τιμή 7.0, οπότε και σε αυτή την περίπτωση ακολουθούσε επώαση στους 37°C για 18 – 24 ώρες (βλ. Σχήμα 2).

2.4.2. Ενοφθαλμισμός

Ποσότητα ενοφθαλμίσματος ίση κάθε φορά με 0,1 ml (περίπου 1% του τελικού όγκου), λαμβάνεται από την τελευταία ανανέωση των τεσσάρων μικροοργανισμών και μεταφέρεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες, έκαστος των οποίων περιέχει 10 ml BHI broth. Με την παρέλευση 18 – 24 ωρών επώασης στους 37°C, πραγματοποιούνταν ενοφθαλμισμός των υποστρωμάτων που είχαν εισαχθεί εκ των προτέρων στις οπές του microplate (ποσότητα 30 μl υποστρώματος σε κάθε οπή) με ποσότητα 3 μl από τον πλήρως ανανεωμένο μικροοργανισμό σε BHI broth. Τα microplates με τα ενοφθαλμισμένα υποστρώματα τίθενται προς επώαση στους 37°C και ανα μια ώρα από τη στιγμή του ενοφθαλμισμού τους παρακολουθείται η πορεία και η φάση ανάπτυξης των μικροοργανισμών μέσω μέτρησης της οπτικής πυκνότητας (Optical Density - OD) (βλ. Σχημα 1).

Στην περίπτωση της **όξινης καταπόνησης** των τεσσάρων στελεχών ίδια ποσότητα ενοφθαλμίσματος (0,1 ml) μεταφέρεται από τον δοκιμαστικό σωλήνα με TSBYE pH 7.0 της δεύτερης ανανέωσης σε πλαστικό περιέκτη Falcon που επίσης περιέχει 10 ml TSBYE σε pH 7.0. Οι ενοφθαλμισθείσες ποσότητες των 10 ml επωάζονται στους 37°C για τόσο χρονικό διάστημα όσο απαιτείται προκειμένου ο μικροοργανισμός να βρεθεί στο επιθυμητό μέσον της εκθετικής φάσης αναπτύξεώς του (mid-exponential phase). Τότε και μόνον τότε σταματά η επώαση, οπότε οι καλλιέργειες του στελέχους που περιέχονται στους περιέκτες falcon, αφού πρώτα ισοζυγιστούν, φυγοκεντρώνονται (3800 rpm x 15 min, 4°C) ώστε τα περιεχόμενα σε αυτές βακτηριακά κύτταρα να κατακρημνιστούν και υπό μορφή ιζήματος να συλλεχθεί η σχηματισθείσα βιομάζα (της τάξεως $\sim 10^8$ cfu/ml) (βλ. Σχήμα 2).

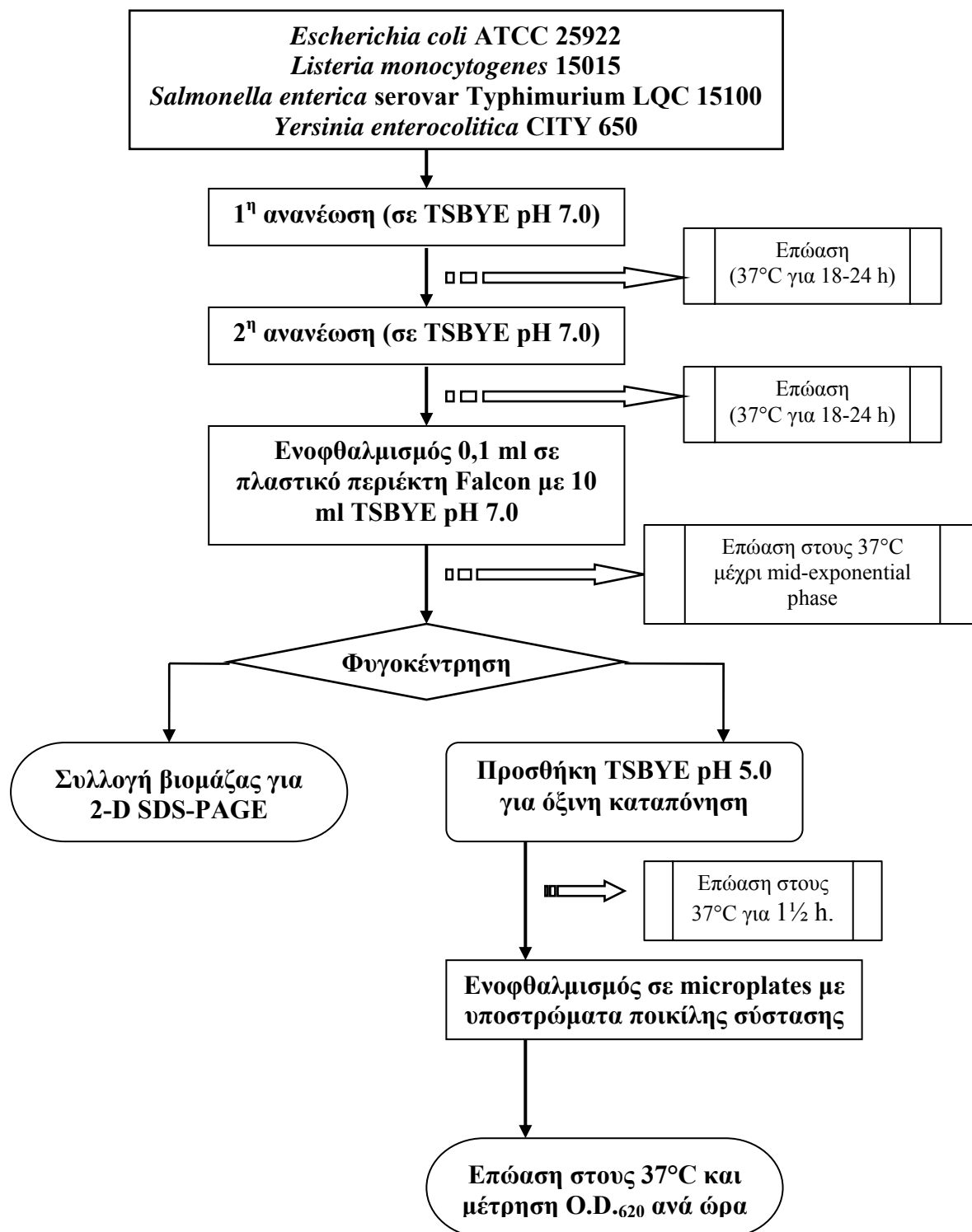


Σχήμα 1: Διάγραμμα ροής ανανεώσεων και ενοφθαλμισμών

2.4.3. Παραλαβή βιομάζας και όξινη καταπόνηση

Η παραλαμβανόμενη από τη φυγοκέντρηση βιομάζα αξιοποιείται με δύο διαφορετικούς τρόπους. Μέρος αυτής τοποθετείται απευθείας στους -20°C για βραχυχρόνια αποθήκευση πριν την ηλεκτροφόρηση πηκτής δύο διαστάσεων (2-D SDS PAGE) που θα επακολουθήσει και το πρωτεϊνικό περιεχόμενο του μέρους αυτού της βιομάζας θα χρησιμεύσει ως μάρτυρας κατά τη συγκριτική μελέτη των πρωτεωμάτων που θα προκύψουν μετά την προσαρμογή στις συνθήκες όξινης καταπόνησης στις οποίες θα υποβληθούν οι μικροοργανισμοί. Το δεύτερο μέρος της βιομάζας υφίσταται **όξινη καταπόνηση (acid stress)**. Σ' αυτή τη φάση το υπερκείμενο που προέκυψε από τη φυγοκέντρηση του προηγούμενου σταδίου του ενοφθαλμισμού απορρίπτεται και στη βιομάζα που έχει κατακαθίσει προστίθεται TSBYE σε pH 5.0 του οποίου η τιμή έχει ρυθμιστεί από πριν κατά τον ίδιο τρόπο όπως και προηγούμενα (δηλ. με γαλακτικό οξύ περιεκτικότητας 85% (w/w)) και εισάγεται πρὸς επώαση στους 37°C για χρονικό διάστημα ίσο με $1\frac{1}{2}$ ώρα. Με την παρέλευση της περιόδου αυτής, οι μικροοργανισμοί που υπέστησαν όξινη καταπόνηση, ενοφθαλμίζονται σε αντίστοιχα ίδιας σύστασης υποστρώματα

(ευρισκόμενα εντός των οπών των microplates) με αυτά που είχαν ενοφθαλιστεί οι μη έχοντες υποστεί τη διαδικασία αυτή της καταπόνησης. Ακολουθεί και σε αυτή την περίπτωση επώαση στους 37°C και ανα μια ώρα από τη στιγμή του ενοφθαλισμού τους παρακολουθείται η πορεία και η φάση ανάπτυξης των μικροοργανισμών μέσω μέτρησης της οπτικής πυκνότητας (Optical Density - OD) (βλ. Σχήμα 2).



Σχήμα 2: Διάγραμμα ροής ανανεώσεων και ενοφθαλισμών στην περίπτωση της όξινης καταπόνησης

2.4.4. Έκπλυση βιομάζας

Το επόμενο στάδιο στην πειραματική διαδικασία είναι ο προσδιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου των κυττάρων των τεσσάρων εξεταζόμενων μικροοργανισμών *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* 15015, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 και *Yersinia enterocolitica* CITY 650. Κατά τη διαδικασία απομόνωσης των πρωτεϊνών από τις κυτταρικές καλλιέργειες των μικροοργανισμών, κύτταρα που συλλέχθηκαν στο μέσον της εκθετικής φάσης ανάπτυξης (mid-exponential phase) των βακτηριακών στελεχών, καθώς και μέρος της βιομάζας που προέκυψε μετά την προσαρμογή σε συνθήκες όξινης (pH 5.0) καταπόνησης, υφίστανται διαδικασία έκπλυσης, ώστε να απομακρυνθούν τελικά προϊόντα μεταβολισμού που τυχόν βρίσκονται δεσμευμένα επί των κυττάρων του μικροοργανισμού. Η έκπλυση πραγματοποιείται με προσθήκη σε κάθε πλαστικό περιέκτη falcon, 10 ml φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (NaPBS), του οποίου η σύσταση δίδεται στον Πίνακα 7, ενώ ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3500 rpm για 10 min στους 4°C. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται εις τριπλούν. Μετά την έκπλυση, το σύνολο της βιομάζας για κάθε διαφορετική περίπτωση συλλέγεται και μεταφέρεται σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος δειγμάτων (sample buffer), περιεκτικότητας 20 mmol/l σε Tris-HCl** με pH 8.8.

Πίνακας 7: Σύσταση 20 mmol/l φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (NaPBS) με pH 7.3

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ
Ένυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο	0.1928 % (w/v)
Επταϋδρικό όξινο φωσφορικό νάτριο*	0.1616 % (w/v)
Χλωριούχο νάτριο	0.8% (w/v)

*Λόγω μη διαθεσιμότητας του συγκεκριμένου άλατος στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων, υπό μορφή έτοιμου εμπορικού σκευάσματος, η αναφερόμενη περιεκτικότητα του επταϋδρικού όξινου φωσφορικού νατρίου υπολογίστηκε ότι ισοδυναμεί με προσθήκη 0,1073 % (w/v) διϋδρικού όξινου φωσφορικού νατρίου.

** Η παρασκευή του Tris-HCl 20 mmol/l γίνεται με προσθήκη 2,422 g Tris base σε 800 ml διπλά απεσταγμένου νερού, ρύθμιση του pH (στο 8.8) με υδατικό διάλυμα HCl (HCl_{aq}) και πλήρωση μέχρι όγκου 1L με διπλά απεσταγμένο νερό.

2.4.5. Λύση των βακτηριακών κυττάρων

Στο εσωτερικό των βακτηριακών κυττάρων που περιέχονται στο ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων, εκτός των επιθυμητών πρωτεϊνών περιέχονται και πολλά άλλα βιολογικά μακρομόρια (π.χ. νουκλεϊκά οξέα). Σε κάθε περίπτωση τα συστατικά αυτά απελευθερώνονται στο διάλυμα, μέσω της λύσης των κυττάρων η οποία προκαλείται εξαιτίας της αποδιάταξης του κυτταρικού περιβλήματος. Διακρίνουμε δύο κατηγορίες μεθόδων αποδιάταξης του κυτταρικού περιβλήματος, τις μηχανικές και τις μη μηχανικές. Η πρόσληψη των ενδοκυτταρικών προϊόντων από το εσωτερικό των μικροοργανισμών στην παρούσα μελέτη έγινε με μηχανικές μεθόδους (υπέρηχοι (50 W x 5 min)), όπου το περίβλημα του κυττάρου αποδιοργανώνεται χωρίς την παρουσία πρόσθετων χημικών ή άλλων παραγόντων, οι οποίοι δύνανται να επηρεάσουν στη συνέχεια το αποτέλεσμα της πειραματικής διαδικασίας.

Οι υπέρηχοι αποτελούν μια ευρύτατα χρησιμοποιούμενη μηχανική μέθοδο λύσης κυττάρων. Πρόκειται για ήχους υψηλής συχνότητας παραγόμενους ηλεκτρονικά, οι οποίοι μεταφέρονται μέσω ενός μεταλλικού ρύγχους σε κυτταρικό εναιώρημα κατάλληλης συγκέντρωσης. Η φιλοσοφία της λύσης με υπέρηχους στηρίζεται στη δημιουργία κοιλοτήτων στο κυτταρικό εναιώρημα (Tzannis, 1991). Εντούτοις, επιστάται η προσοχή κατά την εφαρμογή της μεθόδου, καθότι παρατηρείται ανάπτυξη υψηλών θερμοκρασιών, ικανών να προκαλέσουν ανεπιθύμητες μετουσιώσεις στις πρωτεΐνες. Γι' αυτό και όλη η διαδικασία διεξάγεται υπό ψύξη σε λουτρό υπέρηχων, με ενδιάμεσες διακοπές ενός λεπτού.

2.4.6. Μέθοδος Bradford προσδιορισμού πρωτεϊνών

Η μέθοδος Bradford είναι μια φασματοσκοπική αναλυτική διαδικασία προσδιορισμού πρωτεϊνών, με την οποία μετράται η συγκέντρωση πρωτεΐνης σε κάποιο διάλυμα. Πρόκειται για μια αντικειμενική μέθοδο προσδιορισμού πρωτεϊνών, αφού υπάρχει άμεση εξάρτηση μεταξύ της προσδιοριζόμενης πρωτεΐνης και της σύστασής της σε αμινοξέα. Ο ποσοτικός προσδιορισμός είναι απαραίτητος προκειμένου η ποσότητα της πρωτεΐνης που θα λάβουμε και θα υποστεί μετέπειτα ηλεκτροφόρηση να είναι ίδια σε κάθε περίπτωση (κάτι το οποίο αντικατοπτρίζεται στο αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης).

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη χρωματική αλλαγή σε συνδυασμό με την αλλαγή στην παρατηρούμενη απορρόφηση της χρωστικής Coomassie, όταν η πρόδρομος κόκκινη μορφή της χρωστικής αλλάζει και σταθεροποιείται σε μορφή

χρώματος μπλε (Coomassie blue) με τη δέσμευση επί της πρωτεΐνης. Η ποσότητα του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής στο διάλυμα αποτελεί μέτρο της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης. Ο προσδιορισμός γίνεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm. Η επιλογή του συγκεκριμένου μήκους κύματος αντιστοιχεί στο μέγιστο της απορρόφησης του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής.

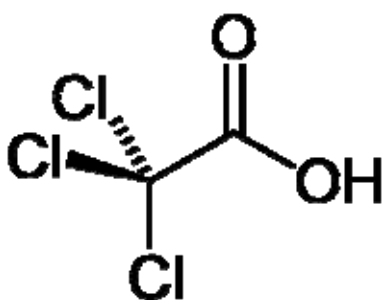
Όπως συμβαίνει με όλες τις φασματοσκοπικές μεθόδους, είναι απαραίτητη η δημιουργία πρότυπης καμπύλης, μέσω της οποίας επιτυγχάνεται ο ποσοτικός προσδιορισμός. Η καμπύλη είναι γραμμική για ένα μικρό εύρος τιμών, το οποίο εκτείνεται από 2 µg/ml μέχρι 120 µg/ml.

Επειδή η μέθοδος Bradford βασικά μετράει την ποσότητα αργινίνης και κατάλοιπα υδρόφοβων αμινοξέων, η σύσταση της πρωτεΐνης σε αμινοξέα μπορεί να μεταβάλει την καμπύλη απορρόφησης-συγκέντρωσης, ανάλογα με το ποσοστό συμμετοχής της αργινίνης ή των υδρόφοβων αμινοξέων σε κάθε πρωτεΐνη. Επομένως, καθίσταται αναγκαία η χρήση ενός προτύπου (π.χ. βόεια αλβουμίνη ορού, Bovine Serum Albumin ή BSA) του οποίου η πρωτεΐνη θα ομοιάζει σε μεγάλο βαθμό με τη σύσταση της προσδιοριζόμενης πρωτεΐνης. Ωστόσο, κατά την εκτέλεση της μεθόδου θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πιθανότητα συστηματικού λάθους, εξαιτίας διαφορετικής σύστασης σε αμινοξέα για όλες τις προσδιοριζόμενες πρωτεΐνες.

Η μέθοδος λαμβάνει χώρα μετά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων και αφού πρώτα τα εναιωρήματα εντός των ρυθμιστικών διαλυμάτων δειγμάτων φυγοκεντρηθούν (12000 rpm x 20 min, 4°C), ούτως ώστε να διαχωριστούν κυτταρικά υπολείμματα και τμήματα του κυτταρικού τοιχώματος από το υπόλοιπο διάλυμα, το οποίο περιέχει τις πρωτεΐνες που απελευθερώθηκαν από το εσωτερικό του κυττάρου.

2.4.7. Κατακρήμνιση με τριχλωροξικό οξύ (TCA)

Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση, έπεται ο διαχωρισμός μεταξύ των πρωτεϊνών



Εικόνα 10. Μόριο τριχλωροξικού οξέος

και των κυτταρικών συστατικών που αιωρούνται στο υπερκείμενο. Η κατακρήμνιση τους πραγματοποιείται με χρήση τριχλωροξικού οξέος.

Το τριχλωροξικό οξύ (TCA) (Εικόνα 10) είναι ένα ανάλογο του οξικού οξέος, στο οποίο τα τρία υδρογόνα της μεθυλομάδας έχουν αντικατασταθεί από ισάριθμα άτομα χλωρίου. Χρησιμοποιείται

ευρέως στη βιοχημεία για την κατακρήμιση μακρομορίων (πρωτεϊνών, DNA και RNA). Το TCA ελαττώνει τη διηλεκτρική σταθερά του μέσου διασποράς και προκαλεί αφυδάτωση, οπότε οι πρωτεΐνες γίνονται αδιάλυτες και καθιζάνουν. Επειδή οι οργανικοί διαλύτες μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες, η κατακρήμιση διεξάγεται σε θερμοκρασίες γύρω στους 0°C, οπότε και χρειάζεται μικρότερο ποσό του διαλύτη εξαιτίας της ελάττωσης της διαλυτότητας των πρωτεϊνών στις χαμηλές θερμοκρασίες. Έτσι χρησιμοποιείται διάλυμα τριχλωροξικού οξέος με τελική περιεκτικότητα 10% (w/v) σε TCA. Η κατακρήμιση γίνεται με λήψη του υπερκειμένου της φυγοκέντρωσης και τοποθέτησή του στο προαναφερθέν διάλυμα TCA για 1 ώρα.

2.4.8. Ανάκτηση πρωτεΐνης

Το ίζημα που προκύπτει από την επίδραση τριχλωροξικού οξέος επί του υπερκειμένου της φυγοκέντρωσης δεν αποτελείται αποκλειστικά από πρωτεΐνη, αλλά περιλαμβάνει και κάποια δεσμευμένα μόρια TCA και άλλα κατακρημισθέντα βιολογικά μακρομόρια όπως DNA και RNA που προαναφέραμε. Έτσι προκειμένου το ίζημα να απαλλαγεί από την παρουσία των νουκλεϊκών οξέων και του TCA, προστίθεται σε αυτό ακετόνη. Ακολουθώντας, το ίζημα αφήνεται για περίπου 18 ώρες στους -20°C ώστε η ακετόνη να εκχυλίσει πλήρως τα προαναφερθέντα ανεπιθύμητα συστατικά. Μετά το πέρας των 18 ωρών και την απαραίτητη φυγοκέντρωση (12000 rpm x 15 min, 4°C), το ίζημα εκπλένεται εις διπλούν με ακετόνη και η παραμονή στο διαλύτη να διαρκεί 30 λεπτά έκαστη φορά. Τελικά, μετά από διαδοχικές εκπλύσεις με ακετόνη και αντίστοιχες φυγοκεντρήσεις, λαμβάνεται καθαρή πρωτεΐνη υπό μορφή ιζήματος.

2.4.9. Διαδικασία ηλεκτροφόρησης πηκτής δύο διαστάσεων

Μετά την παραλαβή πρωτεϊνικού ιζήματος απαλλαγμένου από κάθε είδους πρόσμιξη, ακολουθεί η διαδικασία ηλεκτροφόρησης πηκτής δύο διαστάσεων που περιγράφεται παρακάτω.

2.4.9.1. Προετοιμασία του δείγματος

Σε πρώτο στάδιο είναι αναγκαία η επαναιώρηση της ληφθείσας ποσότητας καθαρής πρωτεΐνης. Η επαναιώρηση πραγματοποιείται με διάλυση της πρωτεϊνικής ποσότητας (250 μg) σε ρυθμιστικό διάλυμα ενυδάτωσης (rehydration buffer), το οποίο προστίθεται στο πρωτεϊνικό ίζημα. Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος

ενυδάτωσης φαίνεται στον Πίνακα 8. Κατόπιν, η διαλυθείσα πρωτεϊνική ποσότητα κατανέμεται και εξαπλώνεται σε ειδικό δίσκο ενυδάτωσης/εξισορρόπησης (rehydration/equilibration tray), εντός των διαλύσεων της οποίας τοποθετούνται έτοιμες βαθμιδώσεις pH 3 – 10 υπό μορφή λωρίδας (ready IPG strips) μήκους 17 cm. Ακολούθως, η βαθμιδωτή λωρίδα pH επικαλύπτεται με ορυκτό έλαιο (mineral oil) για την παρεμπόδιση εξάτμισης κατά τη διαδικασία ενυδάτωσης. Τέλος, το σύστημα αφού πρώτα καλυφθεί με παρεχόμενο πλαστικό κάλυμα το οποίο εφαρμόζει κατάλληλα στο δίσκο, τίθεται σε λειτουργία για 11 – 16 ώρες έτσι ώστε η περιεχόμενη πρωτεΐνη να διαχυθεί και να ενσωματωθεί στη βαθμιδωτή λωρίδα pH 3 – 10.

Πίνακας 8: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ενυδάτωσης πρωτεϊνών (BIO-RAD)

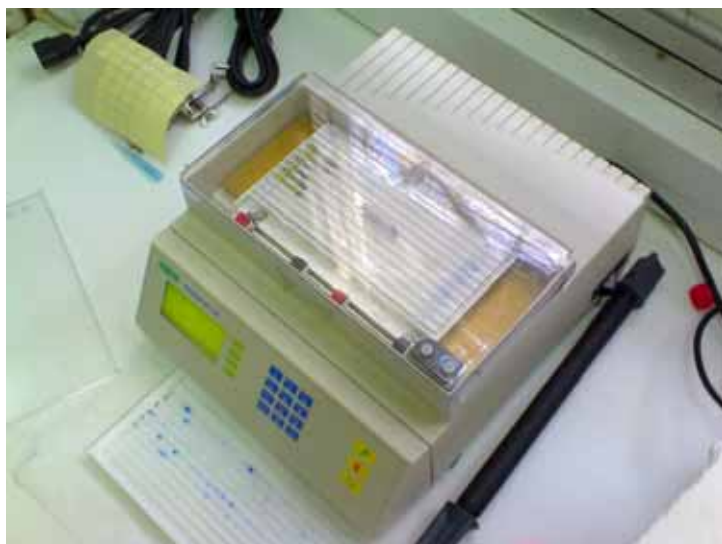
ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ
Ουρία	48% (w/v)
CHAPS	2% (w/v)
Διθειοθρεϊτόλη	1% (w/v)
Αμφολύτες Bio-Lyte 3/10	0.2% (w/v)
Μπλε βρωμοφαινόλης	ίχνος

Στο σημείο αυτό οφείλουμε να διευκρινήσουμε, ότι για τον ευκρινή εν τέλει διαχωρισμό των πρωτεϊνικών στιγμάτων και την επιτυχία της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων, απαιτείται ποσότητα 250 µg πρωτεΐνης, ενώ ο ενδεικνυόμενος όγκος διαλυθείσας πρωτεϊνικής ποσότητας για το δεδομένο μήκος της βαθμιδωτής λωρίδας του pH (17cm) είναι 185 µl.

2.4.9.2. Ισοηλεκτρικός εστιασμός

Ο ισοηλεκτρικός εστιασμός (IEF) είναι μια ηλεκτροφορητική μέθοδος διαχωρισμού των συστατικών ενός μίγματος. Κατ' αυτήν τα συστατικά διαχωρίζονται με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI). Έτσι, ταυτόχρονα με το διαχωρισμό επιτυγχάνεται και ο προσδιορισμός του ισοηλεκτρικού τους σημείου. Με τη μέθοδο αυτή, οι πρωτεΐνες κινούνται σε ένα υπόστρωμα με βαθμίδωση pH (strip) στο οποίο έχει εφαρμοστεί διαφορά δυναμικού (V), μέχρι να συναντήσουν το pH στο οποίο τα θετικά τους φορτία εξισώνονται με τα αρνητικά (pI), οπότε η κίνησή τους σταματά, ακινητοποιούνται και εστιάζονται σε στενές ζώνες.

Αφού λοιπόν παρέλθει το προβλεπόμενο χρονικό διάστημα (11-16 h) και η πρωτεϊνική ποσότητα έχει ενσωματωθεί πλήρως στη βαθμιδωτή λωρίδα του pH, λαμβάνει χώρα ο ισοηλεκτρικός εστιασμός των πρωτεϊνών. Ο τελευταίος διεξάγεται στους 20°C, με τη βοήθεια συσκευής (Εικόνα 11) η οποία και προγραμματίζεται σύμφωνα με ένα πρωτόκολλο τριών σταδίων (Πίνακας 9).



Σε κάθε περίπτωση το μέγιστο του διερχόμενου ρεύματος είναι 50 $\mu\text{A}/\text{strip}$.

Εικόνα 11: Συσκευή ισοηλεκτρικού εστιασμού Bio-Rad Protean IEF Cell (BIO-RAD)

Πίνακας 9: Πρόγραμμα ισοηλεκτρικού εστιασμού πρωτεϊνών, για IPG strip μήκους 11 cm με pH 3-10 (BIO-RAD)

ΒΗΜΑ	ΔΙΑΦΟΡΑ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ (V)	ΧΡΟΝΟΣ	VOLT-HOURS	ΡΥΘΜΟΣ
1 ^ο	250	20 min	-	Γραμμικός
2 ^ο	8,000	2.5 h	-	Γραμμικός
3 ^ο	8,000	-	20,000	Ταχύς
Σύνολο		5.3 h	~30,000	

2.4.9.3. Προετοιμασία για τη δεύτερη διάσταση

Μετά την ολοκλήρωση του ισοηλεκτρικού εστιασμού (1^η διάσταση 2D-GE) και προτού προχωρήσουμε στο δεύτερο βήμα που δεν είναι άλλο από το διαχωρισμό των πρωτεϊνών κατά μοριακό βάρος (2^η διάσταση 2D-GE), είναι απαραίτητο να έχει γίνει μια προεργασία. Κατ' αρχήν θα πρέπει να έχουν ετοιμαστεί εκ των προτέρων οι πηκτές (gels) πολυακρυλαμιδίου που θα χρησιμοποιηθούν για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών. Οι πηκτές αυτές έχουν περιεκτικότητα 12,5%T. Επίσης, θα πρέπει να έχει προετοιμαστεί, ανάλογα με τις ανάγκες, επαρκής ποσότητα ρυθμιστικού

διαλύματος ηλεκτροδίων (electrode or running buffer), η σύσταση του οποίου παρουσιάζεται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροδίων με pH 8.3 (BIO-RAD)

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
Τριυδροξυμεθυλοαμινομεθάνιο (Tris-base)	15 g/l
Γλυκίνη	72 g/l
SDS	5 g/l

Κάτι το οποίο πρέπει να τονιστεί σ' αυτό το σημείο είναι η αναγκαιότητα της διαδοχικής τοποθέτησης των βαθμιδωτών λωρίδων pH (3 έως 10) σε 4 ml δύο ρυθμιστικών διαλυμάτων εξισορρόπησης (equilibration buffers I & II), με τα οποία και επιτυγχάνονται οι απαραίτητες συνθήκες για μετάβαση στην SDS-PAGE. Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης I (equilibration buffer I) δίνεται στον Πίνακα 11.

Πίνακα 11: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης I (BIO-RAD)

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ
Ουρία	36% (w/v)
SDS	2% (w/v)
Tris-HCl, pH 8.8	5.9% (v/v)
Γλυκερόλη	20% (v/v)
Διθειοθρεϊτόλη*	2% (w/v)

*Το ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης II (equilibration buffer II) έχει ακριβώς την ίδια σύσταση με το πρώτο, μόνον που σε αυτό δεν προστίθεται διθειοθρεϊτόλη.

Τα προαναφερθέντα ρυθμιστικά διαλύματα παρασκευάζονται περίπου 15 λεπτά πριν από τη χρήση τους, ενώ κατά την παραμονή των βαθμιδωτών λωρίδων pH στο ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης I και την ήπια ανακίνηση που ακολουθεί για 10 λεπτά, στο ενδιάμεσο χρονικό διάστημα γίνεται προσθήκη 0,5 g ιωδοακεταμιδίου στο δεύτερο ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης, με παράλληλη ανάδευση για την πλήρη διαλυτοποίησή του. Με το πέρας της διαλυτοποίησης έχουμε τοποθέτηση των λωρίδων και σ' αυτό το διάλυμα εξισορρόπησης με παράλληλη και πάλι ανακίνηση.

2.4.9.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κατά Μοριακό Βάρος

Η μέθοδος SDS-PAGE χρησιμοποιείται στα πλαίσια της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης πηκτής δύο διαστάσεων, με την οποία και επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών βάσει του μεγέθους τους, καθώς περνούν διά μέσου των πόρων της πηκτής πολυακρυλαμιδίου. Οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται υπό την επίδραση *δωδεκυλοθειικού νατρίου* (SDS) και *διθειοθρεϊτόλης* (DTT). Η μέθοδος διαχωρίζει και επιτρέπει την εκτίμηση του μοριακού βάρους των διαχωριζόμενων πρωτεϊνών σε πολύ καλό βαθμό, εάν παράλληλα μαζί με τα εξεταζόμενα δείγματα, υποστεί ηλεκτροφόρηση και ένα μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους το οποίο ονομάζεται και δείκτης μοριακών βαρών (Πίνακας 12).

Πίνακας 12: Σύσταση δείκτη μοριακών βαρών Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range (BIO-RAD)

ΠΡΩΤΕΪΝΗ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΜΟΡΙΑΚΟ ΒΑΡΟΣ (kDa)
Μυοσίνη	Σκελετικός μύς κουνελιού	207.345
β-γαλακτοζιδαση	<i>E.coli</i>	114.363
Βόεια αλβουμίνη ορού	Πλάσμα αίματος βοός	78.444
Οβαλβουμίνη	Ασπράδι αυγού	53.086
Ανθρακική ανυδράση	Ερυθροκύτταρα βοός	35.719
Παρεμποδιστής τρυψίνης σόγιας	Σόγια	28.329
Λυσοζύμη	Ασπράδι αυγού	19.325
Απροτινίνη	Πάγκρεας βοός	6.973

Μετά την απομάκρυνσή τους από τα ρυθμιστικά διαλύματα εξισορρόπησης, οι πρωτεΐνες των βαθμιδωτών λωρίδων pH είναι έτοιμες να περάσουν στη δεύτερη διάσταση της 2D-GE και να διαχωριστούν σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος. Έτσι οι ακινητοποιημένες βαθμιδώσεις του pH, με πολύ προσεκτικούς χειρισμούς, αφού πρώτα εμβαπτιστούν σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων, ενσωματώνονται στο άνω μέρος των πηκτών, χρησιμοποιώντας αγαρόζη για την επικάλυψη και στεγανοποίησή τους. Στη συνέχεια ακολουθεί η συναρμολόγηση της συσκευής ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 12) και η πλήρωση των δεξαμενών αυτής με ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροδίων. Το τμήμα ψύξης της συσκευής ηλεκτροφόρησης συνδέεται με παροχή νερού και τα ηλεκτρόδια με συσκευή τροφοδοσίας συνεχούς ρεύματος. Μετά απ' όλα αυτά ξεκινά η ηλεκτροφόρηση με ρύθμιση του ρεύματος στα 8 mA

ανά πηκτή και σταθερή παροχή νερού. Με τη συμπλήρωση μιας ώρας από την έναρξη της ηλεκτροφόρησης, η οποία χρονικά συμπίπτει με τη μετάβαση του ορατού



Εικόνα 12: Συσκευή ηλεκτροφόρησης Bio-Rad Protean II

μετώπου της ηλεκτροφόρησης από το τμήμα της **πηκτής συσσώρευσης** (stacking gel) στο τμήμα της **διαχωριστικής πηκτής** (separating gel) η ένταση του ρεύματος αυξάνεται στα 20 mA και διατηρείται μέχρι το τέλος της ηλεκτροφορητικής διαδικασίας (περίπου 4-5 ώρες επιπλέον από την έναρξη, δηλ. σύνολο περίπου 5-6 ώρες). Η παρακολούθηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται μέσω της μετατόπισης του μετώπου του μπλε της βρωμοφαινόλης, που είναι παρούσα στο προαναφερθέν διάλυμα αγαρόζης.

2.4.10. Εμφάνιση πρωτεϊνών

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το οποίο καθορίζεται από τη μετακίνηση του μετώπου των πρωτεϊνών που ρέουν δια μέσου των πόρων της πηκτής πολυακρυλαμιδίου στο τμήμα διαχωρισμού της πηκτής, η παροχή του ρεύματος διακόπτεται και η συσκευή αποσυναρμολογείται. Η ενιαία πηκτή αποκολλάται προσεκτικά από τις πλάκες ηλεκτροφόρησης και το τμήμα πηκτής συσσώρευσης (stacking gel) αποκόπτεται και απορρίπτεται. Η εναπομείνουσα διαχωριστική πηκτή (separating gel) υφίσταται ειδική επεξεργασία για την εμφάνιση των διαχωρισθέντων, υπό μορφή στιγμάτων, πρωτεϊνών.

2.4.10.1. Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμιδίου

Η χρώση των πηκτών πολυακρυλαμιδίου της ηλεκτροφόρησης γίνεται με χρησιμοποίηση της χρωστικής Bio-Safe Coomassie (G250 stain) της BIO-RAD. Η συγκεκριμένη χρωστική ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των χρωστικών Coomassie (γνωστές και ως χρωστικές Coomassie Brilliant), που γενικά χρησιμοποιούνται στη χρώση διαχωρισθέντων ηλεκτροφορητικά πρωτεϊνών. Από το σύνολο των χρωστικών της οικογένειας (R250, G250, R150) η πιο ευαίσθητη είναι η G250, παρουσιάζοντας παράλληλα 10 φορές χαμηλότερο όριο ανιχνευσιμότητας σε σχέση με την κοινά χρησιμοποιούμενη R250.

Η διαδικασία χρώσης με τη χρωστική G250 περιλαμβάνει αρχικά την έκπλυση της πηκτής με απιονισμένο νερό. Η έκπλυση γίνεται υπό ήπια ανακίνηση, διαρκεί 5 λεπτά και επαναλαμβάνεται τρεις φορές. Σε κάθε έκπλυση χρησιμοποιείται νέα ποσότητα νερού. Έπειτα, σειρά έχει η προσθήκη αρκετής ποσότητας χρωστικής (της οποίας η σύσταση δίνεται στον Πίνακα 13) ώστε να καλυφθεί κάθε πηκτή. Οι πηκτές τοποθετούνται σε ανακινούμενη επωαστική τράπεζα για τουλάχιστον 1 ώρα.

Πίνακας 13: Σύσταση χρωστικής πηκτών πολυακρυλαμιδίου

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ
Μεθανόλη	34% (v/v)
Φωσφορικό οξύ	3% (w/v)
Θειϊκό αμμώνιο	15% (w/v)
G250	0.1% (v/v)

2.4.10.2. Αποχρωματισμός των πηκτών

Με την παραπάνω διαδικασία η χρωστική διαχέεται εντός της πηκτής, όμως συνδέεται μόνιμα μόνον με τις πρωτεΐνες. Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών στιγμάτων και η μετέπειτα σάρωση και ταυτόχρονη επεξεργασία των πρωτεωμάτων (Εικόνα 13) δεν είναι δυνατή αν δεν επέλθει ο αποχρωματισμός της πηκτής, ο οποίος και συνίσταται στην απομάκρυνση της χρωστικής από τις περιοχές εκείνες όπου δεν παρατηρείται σύνδεση με τις πρωτεΐνες. Προκειμένου λοιπόν οι πηκτές να αποχρωματιστούν, εκπλένονται με απιονισμένο νερό για 15-30 λεπτά, πάντα υπό ήπια ανακίνηση και με διπλή επανάληψη. Μεγαλύτερης διάρκειας εκπλύσεις δύνανται να

χρειαστούν για την απομάκρυνση της εναπομείνουσας χρωστικής ενώ στο τέλος οι πηκτές συντηρούνται σε απιονισμένο νερό για μερικές ημέρες.



Εικόνα 13: Χρόση πηκτών πολυακρυλαμίδιου και
σάρωση τους για σύγκριση πρωτεωμάτων

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της συμπεριφοράς τεσσάρων στελεχών τροφιμογενών παθογόνων βακτηρίων, υπό συνθήκες ανάπτυξης πολλαπλών εμποδίων και όξινης καταπόνησης. Στο κεφάλαιο 2 είχε περιγραφεί αναλυτικά και η διαδικασία απομόνωσης των πρωτεϊνών, της συλλεχθείσας από τις καλλιέργειες των στελεχών βιομάζας, μια διαδικασία η οποία και αυτή με τη σειρά της θα οδηγήσει προς την κατεύθυνση της ακόμα καλύτερης κατανόησης της συμπεριφοράς των τεσσάρων στελεχών αφού υπεισέρχεται εντός της μελέτης και ο παράγων πρωτέωμα και πως οι συνθήκες όξινης καταπόνησης (pH 5.0) επιδρούν επ' αυτού.

Στη συνέχεια θα παρουσιαστεί ξεχωριστά η συμπεριφορά καθενός εκ των τεσσάρων στελεχών

3.1. Επίδραση των πειραματικών συνθηκών επί του στελέχους *Escherichia coli* ATCC 25922

3.1.1. Ανάπτυξη του στελέχους *E. coli* ATCC 25922

Προκειμένου να καθοριστεί αρχικά ποιοί είναι οι συνδυασμοί pH- a_w στους οποίους ο μικροοργανισμός δύναται να αναπτυχθεί (περιοχές ανάπτυξης–μη ανάπτυξης ή growth–no growth interface) έγινε προκαταρκτικό πείραμα κατά το οποίο το στέλεχος *E. coli* ATCC 25922 ενοφθαλμίστηκε σε υποστρώματα με διαβάθμιση του pH (4.04 έως 7.01) και της ενεργότητας νερού (a_w). Η ρύθμιση του pH γινόταν είτε με γαλακτικό είτε με οξικό οξύ, ενώ η ρύθμιση της a_w πραγματοποιούνταν με προσθήκη χλωριούχου νατρίου συγκεντρώσεων 0, 2, 4, 6 και 8% w/v. Οι συνδυασμοί pH και ενεργότητας νερού των υποστρωμάτων φαίνονται στον Πίνακα 14. Από την ανάπτυξη (ή μη ανάπτυξη) του μικροοργανισμού στα ανωτέρω υποστρώματα προκύπτουν τα αποτελέσματα που φαίνονται στο Σχήμα 3. Από το προκαταρκτικό πείραμα γίνεται εμφανές ότι στην περίπτωση που ως μέσο ρύθμισης του pH χρησιμοποιείται το γαλακτικό οξύ, ανάπτυξη παρατηρείται σε τιμές pH από 5 έως 7 και σε ενεργότητες νερού από 0.977 έως και 0.942. Μικρότερο εύρος ανάπτυξης παρουσιάζει ο μικροοργανισμός στην περίπτωση χρήσης οξικού οξέος, αφού μπορεί και πάλι το pH να είναι μεταξύ των τιμών 5 και 7 αλλά οι ενεργότητες νερού

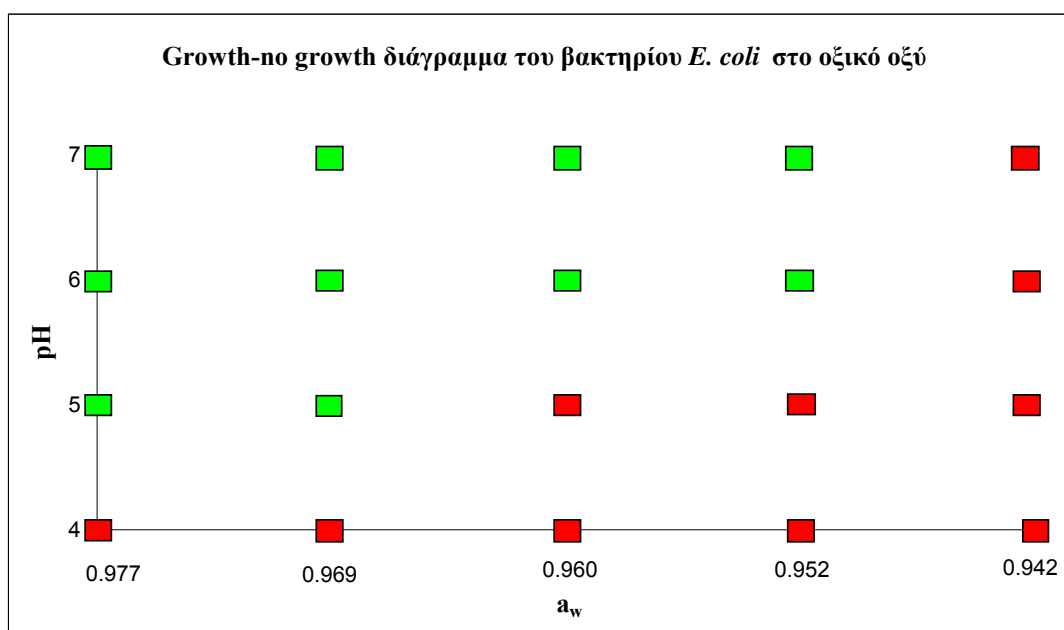
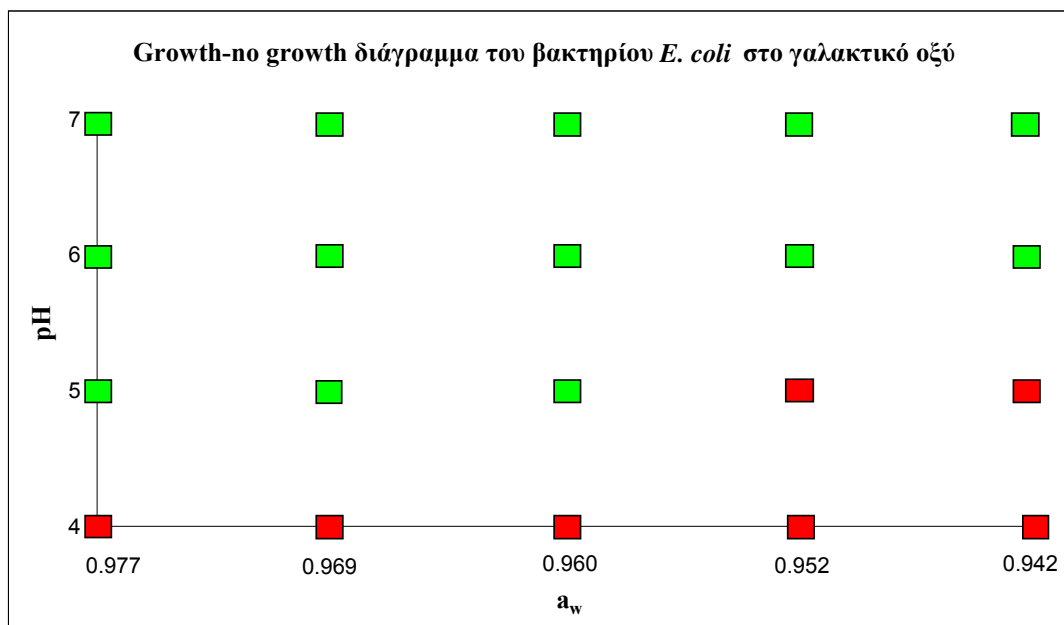
κυμαίνονται από 0.977 έως 0.952. Δίνεται λοιπόν μια πρώτη εικόνα της θανατηφόρου επίδρασης του συνδυασμού των οργανικών οξέων γαλακτικό - οξικό και της ενεργότητας νερού επί του μικροβιακού πληθυσμού.

Πίνακας 14. Τιμές pH και a_w υποστρωμάτων ενοφθαλμισμού *E. coli* ATCC 25922 κατά το προκαταρκτικό πείραμα και το πείραμα στενότερων ορίων ανάπτυξης.

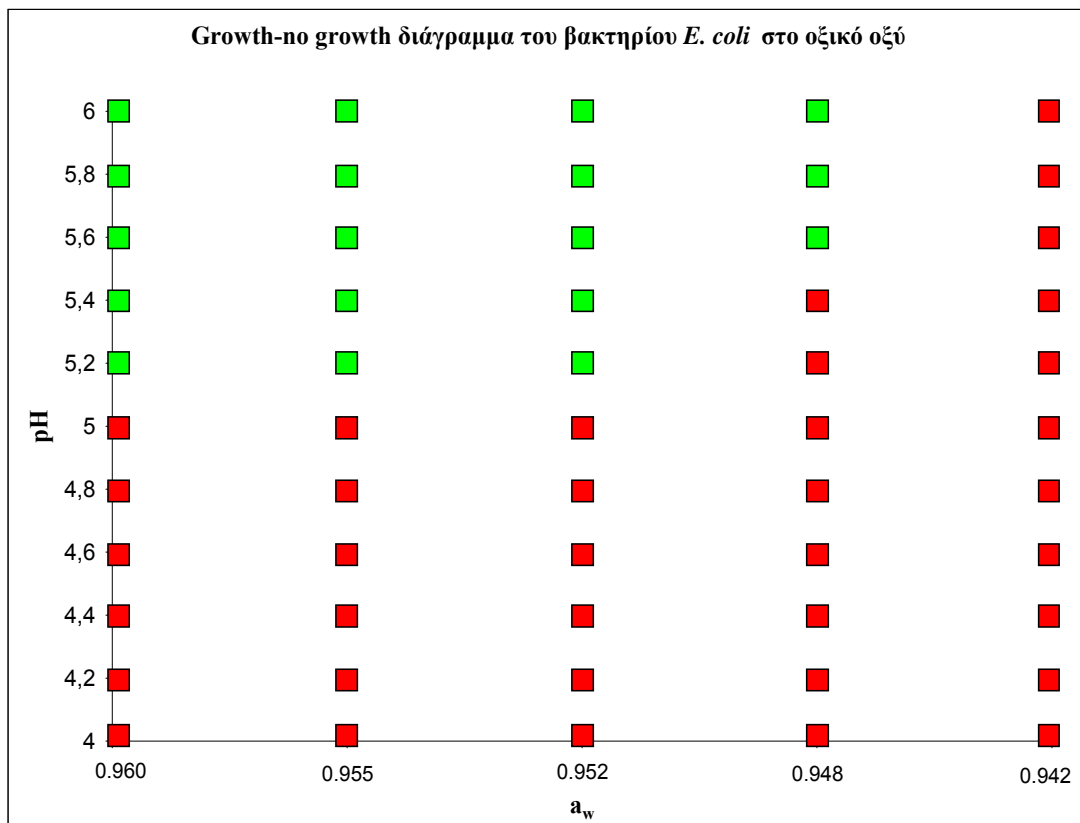
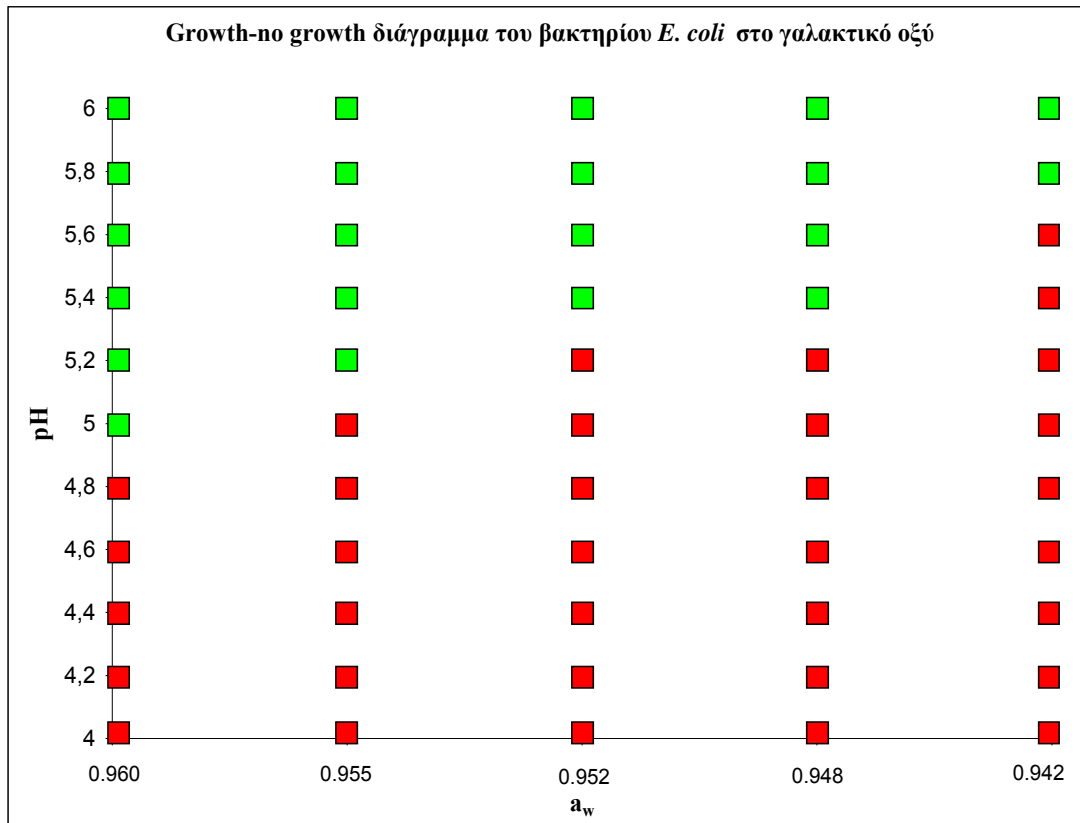
Οργανικό οξύ που χρησιμοποιήθηκε για τη ρύθμιση του pH	Προκαταρκτικό πείραμα		Πείραμα στενότερων ορίων ανάπτυξης	
	Μετρηθείσες τιμές pH	a_w	Μετρηθείσες τιμές pH	a_w
Γαλακτικό οξύ	4.04	0.977 0.969 0.960 0.952 0.942	4.02	0.960 0.955 0.952 0.948 0.942
			4.22	
	5.02		4.41	
			4.60	
	6.02		4.82	
			5.01	
			5.22	
			5.43	
	7.01		5.62	
			5.82	
6.03				
Οξικό οξύ	4.02	0.977 0.969 0.960 0.952 0.942	4.01	0.960 0.955 0.952 0.948 0.942
			4.23	
	5.03		4.43	
			4.62	
	6.01		4.82	
			5.03	
			5.23	
			5.41	
	7.03		5.61	
			5.80	
6.03				

Βάσει των δεδομένων του προκαταρκτικού πειράματος και θέλοντας να εμβαθύνουμε ακόμα περισσότερο στην ικανότητα ανάπτυξης του παθογόνου *E. coli* υπό συγκεκριμένες συνθήκες εμποδίων (pH- a_w), τα όρια ανάπτυξης του μικροοργανισμού αναπροσαρμόστηκαν σε στενότερη κλίμακα όπως φαίνεται και πάλι στον Πίνακα 14. Έτσι οι τιμές pH κυμάνθηκαν από 4 έως 6 (ανά 0.2 – με χρήση και πάλι είτε γαλακτικού είτε οξικού οξέος) και οι ενεργότητες νερού κυμάνθηκαν

από 0.960 έως 0.942 (χρησιμοποιηθείσες συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου από 4 έως 8%w/v ανά 1%). Όπως και στο προκαταρκτικό πείραμα έτσι και τώρα προκύπτει η απεικόνιση της ανάπτυξης-μη ανάπτυξης (growth-no growth interface) του βακτηρίου *E. coli* στο νέο εύρος τιμών pH και ενεργότητας νερού (Σχήμα 4).

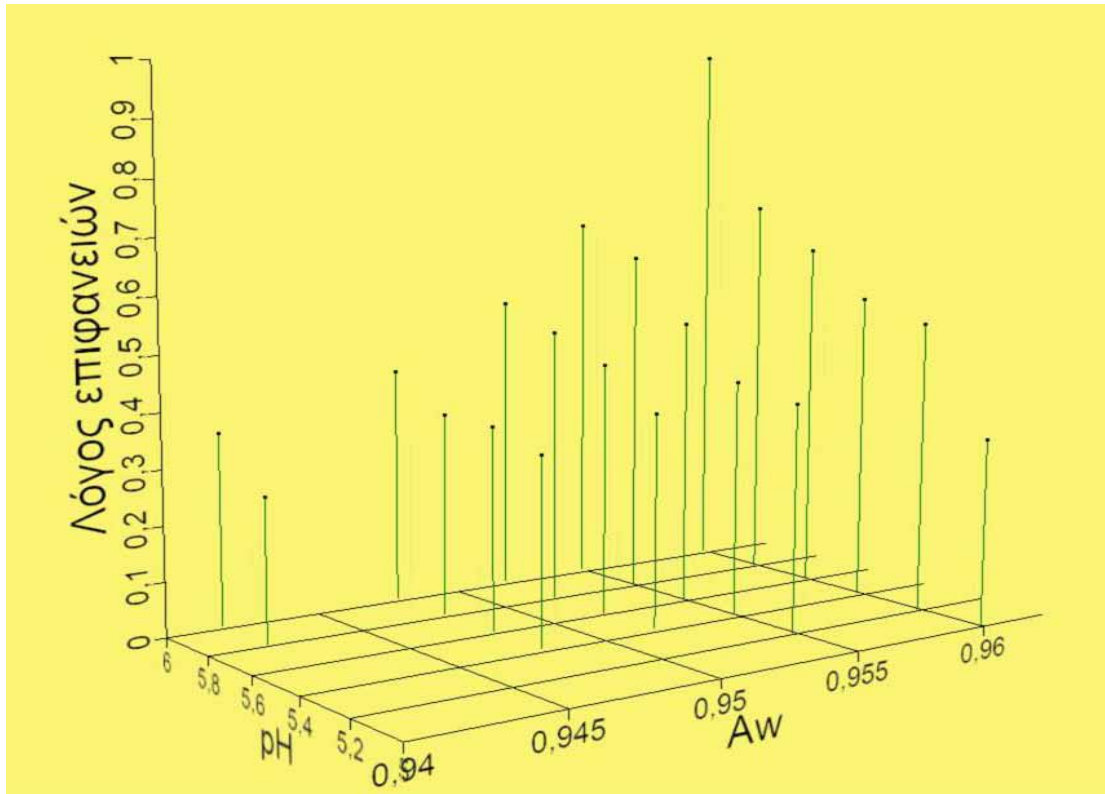


Σχήμα 3. Γραφική απεικόνιση ανάπτυξης-μη ανάπτυξης του βακτηρίου *E. coli* ATCC 25922 σε υποστρώματα με διαβάθμιση του pH και της a_w (προκαταρκτικό πείραμα). Κόκκινα σημεία = δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη στο συγκεκριμένο συνδυασμό pH - a_w . Πράσινα σημεία = παρατηρήθηκε ανάπτυξη στο συγκεκριμένο συνδυασμό pH - a_w .

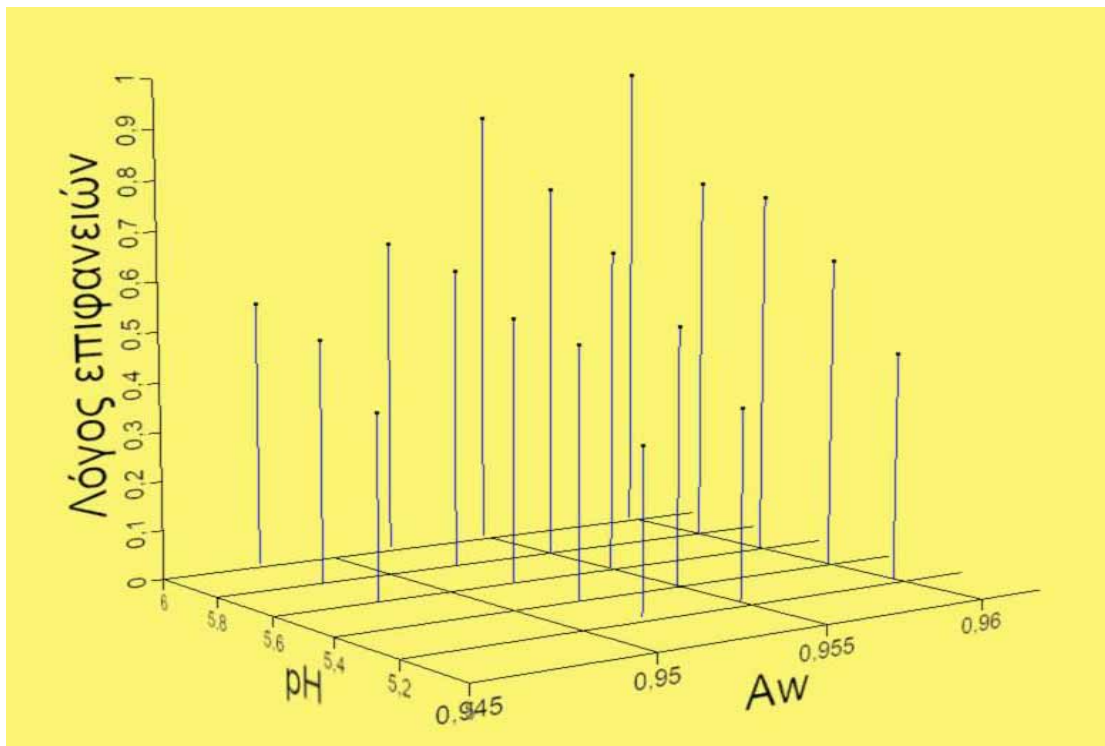


Σχήμα 4. Γραφική απεικόνιση ανάπτυξης-μη ανάπτυξης του βακτηρίου *E. coli* ATCC 25922 σε υποστρώματα με διαβάθμιση του pH και της a_w (πείραμα στενότερων ορίων ανάπτυξης). Κόκκινα σημεία = δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη στο συγκεκριμένο συνδυασμό pH - a_w
Πράσινα σημεία = παρατηρήθηκε ανάπτυξη στο συγκεκριμένο συνδυασμό pH - a_w

Από την ανάλυση του γραφήματος (Σχήμα 4) προκύπτουν χρήσιμες παρατηρήσεις. Φαίνεται ξεκάθαρα η θανατηφόρος επίδραση του γαλακτικού οξέος επί του μικροοργανισμού *E. coli* ATCC 25922, σε τιμές pH από 4.02 έως και 4.82, ανεξαρτήτως της ενεργότητας νερού που επικρατεί. Ενώ σε τιμές pH από 5 έως και 6 και ενεργότητες νερού από 0.960 έως και 0.942, ο μικροοργανισμός παρουσιάζει μια βαθμιαία αυξανόμενη ανεκτικότητα στους συνδυασμούς pH – a_w που επικρατούν όπως φαίνεται και στο γράφημα του Σχήματος 4. Συγκεκριμένα ενώ σε περιβάλλον με pH 5.01 κατορθώνει να επιβιώσει μόνο σε ενεργότητα νερού 0.960, σε περιβάλλον με pH 5.82 και 6.03 επιβιώνει και σε πολύ χαμηλότερες τιμές a_w (0.942). Η ίδια εικόνα φαίνεται να επικρατεί και στην περίπτωση που γίνεται χρήση οξικού οξέος ως μέσου ρύθμισης του pH, μόνο που σε αυτή την περίπτωση οι συνθήκες φαίνεται να είναι πιο αντίξοες για το μικροοργανισμό αφού η ανάπτυξη ξεκινά από pH 5.23 έναντι 5.01 στο γαλακτικό οξύ, ενώ σε τιμές pH 5.8 και 6.03 η μικρότερη τιμή a_w στην οποία εμφανίζει ανάπτυξη ο μικροοργανισμός είναι 0.948 έναντι 0.942 στην περίπτωση του έτερου οργανικού οξέος. Ακόμα καλύτερη απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους *E. coli* ATCC 25922 παρέχεται στα τρισδιάστατα γραφήματα των σχημάτων 5 και 6 (γαλακτικό και οξικό οξύ αντίστοιχα). Στους τρεις άξονες των γραφημάτων εντοπίζονται οι μεταβλητές pH, a_w και ο λόγος της επιφάνειας της σιμοειδούς καμπύλης ανάπτυξης του μικροοργανισμού στον εκάστοτε συνδυασμό pH- a_w προς τη μεγαλύτερη επιφάνεια (κατ'επέκταση και βέλτιστη ανάπτυξη). Ο λόγος των επιφανειών αποτελεί ένα μέτρο σύγκρισης της ανάπτυξης του βακτηρίου σε κάθε ένα συνδυασμό pH- a_w με το συνδυασμό εκείνο που οδηγεί στη βέλτιστη ανάπτυξη. Κοινή παρατήρηση και στα δύο σχήματα είναι ότι όσο αυξάνονται οι τιμές pH και a_w τόσο αυξάνεται και ο λόγος των επιφανειών, με αποτέλεσμα τόσο στο γαλακτικό οξύ όσο και στο οξικό η μέγιστη τιμή του λόγου των επιφανειών (ίση με 1) να εμφανίζεται σε τιμές pH 6.03 και ενεργότητας νερού 0.960. Αντίθετα η μικρότερη τιμή του λόγου των επιφανειών στο γαλακτικό οξύ, εντοπίζεται στο ζεύγος τιμών pH- a_w : 5.82-0.942 και είναι ίση με 0.26, ενώ στο οξικό οξύ εντοπίζεται στο ζεύγος pH- a_w : 5.23-0.952 και είναι ίση με 0.33. Από όσα προαναφέρθηκαν και παρατηρώντας τα Σχήματα 5 και 6 εύκολα συμπεραίνουμε ότι ο λόγος των επιφανειών, στην περίπτωση που ως μέσο ρύθμισης του pH χρησιμοποιήθηκε οξικό οξύ, κυμαίνεται σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τον αντίστοιχο λόγο στο γαλακτικό οξύ κάτι το οποίο σημαίνει ότι στο πρώτο οι τιμές του λόγου των επιφανειών είναι πιο κοντά στη βέλτιστη τιμή απ'ότι στο δεύτερο οξύ.



Σχήμα 5. Τρισδιάστατο συγκριτικό γράφημα τριών μεταβλητών (pH, a_w , λόγος επιφανειών). Απεικονίζεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *E. coli* ATCC 25922 σε υποστρώματα των οποίων το pH έχει ρυθμιστεί με χρήση γαλακτικού οξέος.



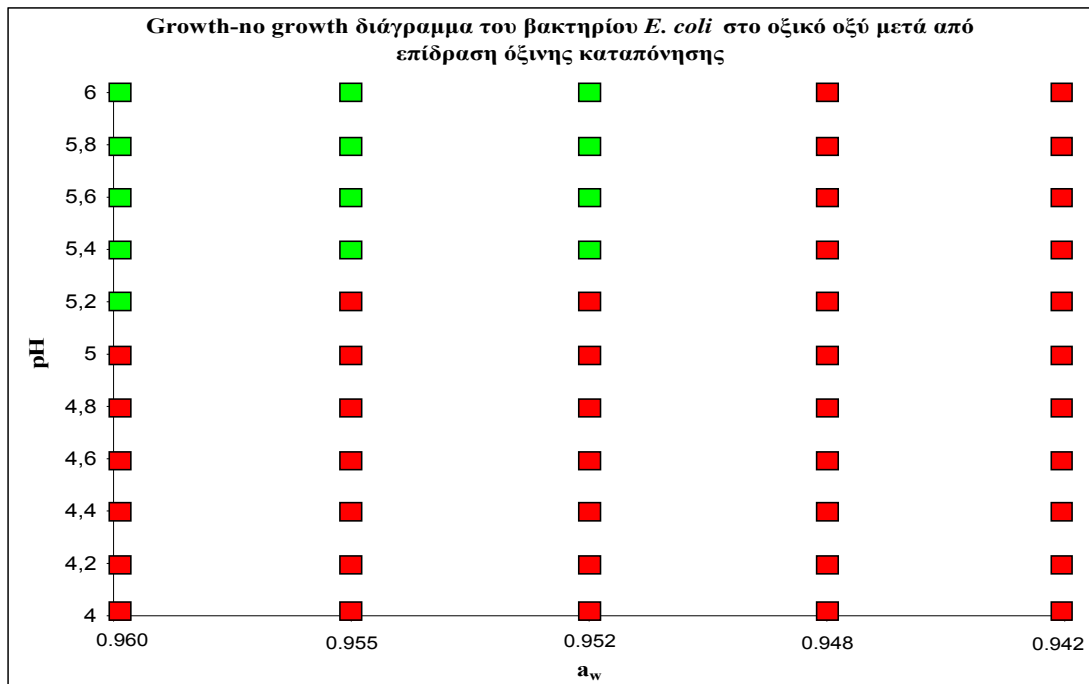
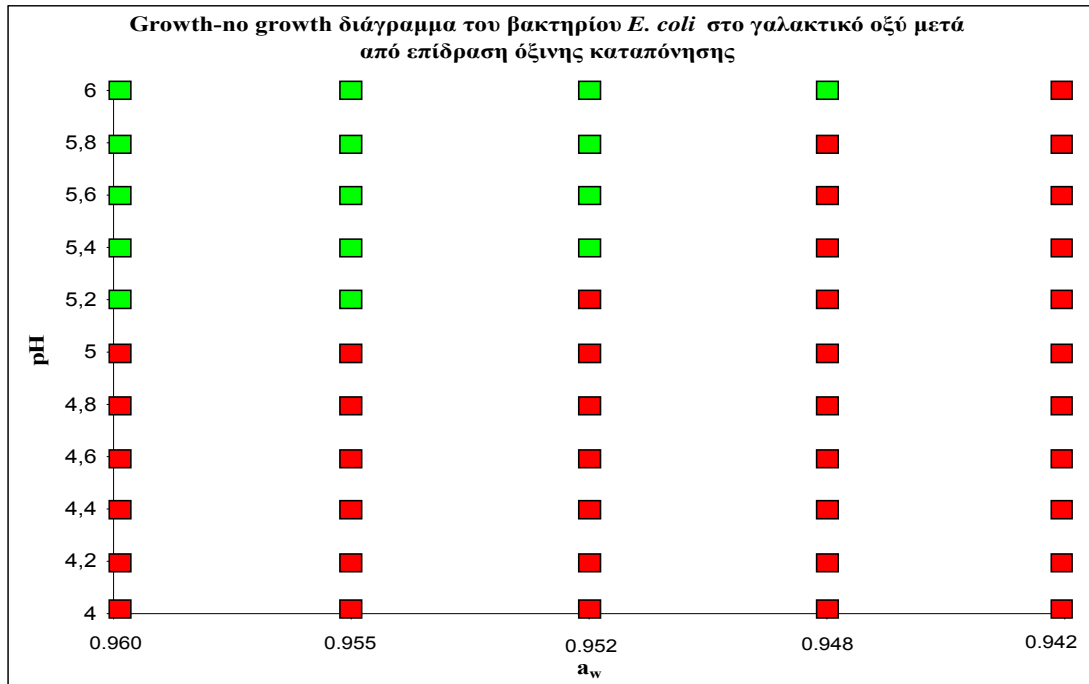
Σχήμα 6. Τρισδιάστατο συγκριτικό γράφημα τριών μεταβλητών (pH, a_w , λόγος επιφανειών). Απεικονίζεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *E. coli* ATCC 25922 σε υποστρώματα των οποίων το pH έχει ρυθμιστεί με χρήση οξικού οξέος.

3.1.2. Ανάπτυξη του στελέχους *Escherichia coli* ATCC 25922 κατόπιν προσαρμογής σε συνθήκες όξινης καταπόνησης – Σύγκριση με συνθήκες μη προσαρμογής

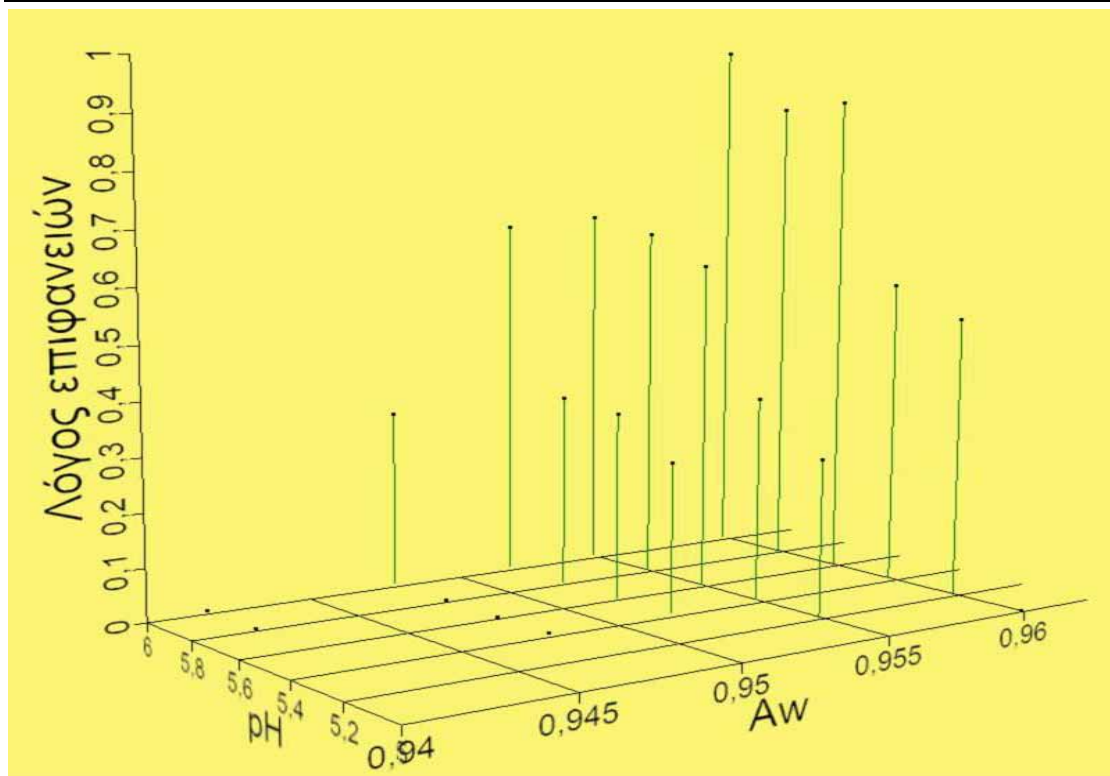
Στην παράγραφο 3.1.1. είδαμε την ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού σε υποστρώματα με διαβάθμιση του pH και της ενεργότητας νερού χωρίς να έχει προηγηθεί προσαρμογή του σε συνθήκες όξινης καταπόνησης. Σ' αυτή την παράγραφο θα δούμε τη συμπεριφορά του βακτηρίου κατά τον ενοφθαλμισμό του στα ίδια υποστρώματα ανάπτυξης (Πίνακας 14) κατόπιν όμως προσαρμογής του σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (TSBYE pH 5.0) και επαγωγής της οξεοανθεκτικότητάς του. Παρατηρώντας τα Σχήματα 7, 8 και 9 που ακολουθούν και συγκρίνοντάς τα με τα αντίστοιχα Σχήματα 4, 5 και 6 της παραγράφου 3.1.1. γίνεται φανερό ότι η έκθεση του βακτηρίου σε συνθήκες όξινης καταπόνησης, είχε ως αποτέλεσμα τη μη ικανότητα μετέπειτα ανάπτυξής του σε ορισμένους από τους συνδυασμούς pH- a_w , που αρχικά (όταν δεν είχε υποστεί όξινη καταπόνηση) είχε αναπτυχθεί (Σχήμα 4). Συγκεκριμένα παρατηρούμε ότι η ανάπτυξη στο γαλακτικό οξύ ξεκινά από κατώτερη τιμή pH 5.22 και ελάχιστη ενεργότητα νερού 0.955 (έναντι 5.01 και 0.960 στη μη προσαρμογή) και φθάνει μέγιστη τιμή pH και ελάχιστη τιμή a_w , 6.03 και 0.948 αντίστοιχα (έναντι 6.03 και 0.942 στη μη προσαρμογή). Ανάπτυξη δεν παρατηρήθηκε καθόλου σε ενεργότητα νερού 0.942. Η ανεκτικότητα του βακτηρίου *E. coli* ATCC 25922 στο οξικό οξύ φαίνεται να είναι για μια ακόμη φορά μειωμένη σε σχέση με το γαλακτικό, γι' αυτό και η ανάπτυξη σ' αυτό το οργανικό οξύ περιορίζεται ακόμα περισσότερο, με το ζεύγος pH- a_w : 5.23 - 0.960 να αποτελεί το σημείο από το οποίο παρατηρείται έναρξη της ανάπτυξης (έναντι 5.23 - 0.952 στη μη προσαρμογή) ενώ το 6.03 - 0.952 να είναι το ανώτερο όριο (έναντι 6.03 - 0.948 στη μη προσαρμογή). Ανάπτυξη δεν παρατηρήθηκε καθόλου σε ενεργότητα νερού 0.948.

Ίδια εικόνα λαμβάνουμε και από τα τρισδιάστατα γραφήματα των σχημάτων 8 και 9 όπου οι συνδυασμοί pH- a_w συναρτώνται με το λόγο των επιφανειών. Παρατηρούμε και πάλι ότι κινούμενοι από μικρότερες σε μεγαλύτερες τιμές pH και a_w αυξάνεται ο λόγος των επιφανειών, κάτι το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι όσο μεγαλύτερη τιμή pH και a_w επικρατεί τόσο πιο ευνοϊκές είναι οι συνθήκες για την ανάπτυξη του βακτηρίου. Η προσαρμογή του στελέχους σε συνθήκες όξινης καταπόνησης όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω, μείωσε το εύρος ανάπτυξης του μικροοργανισμού κάτι το οποίο φαίνεται και στα Σχήματα 8 και 9, με τις σημειακές κουκκίδες (λόγος των επιφανειών ίσος με μηδέν) να είναι εκείνοι οι συνδυασμοί pH- a_w στους οποίους το

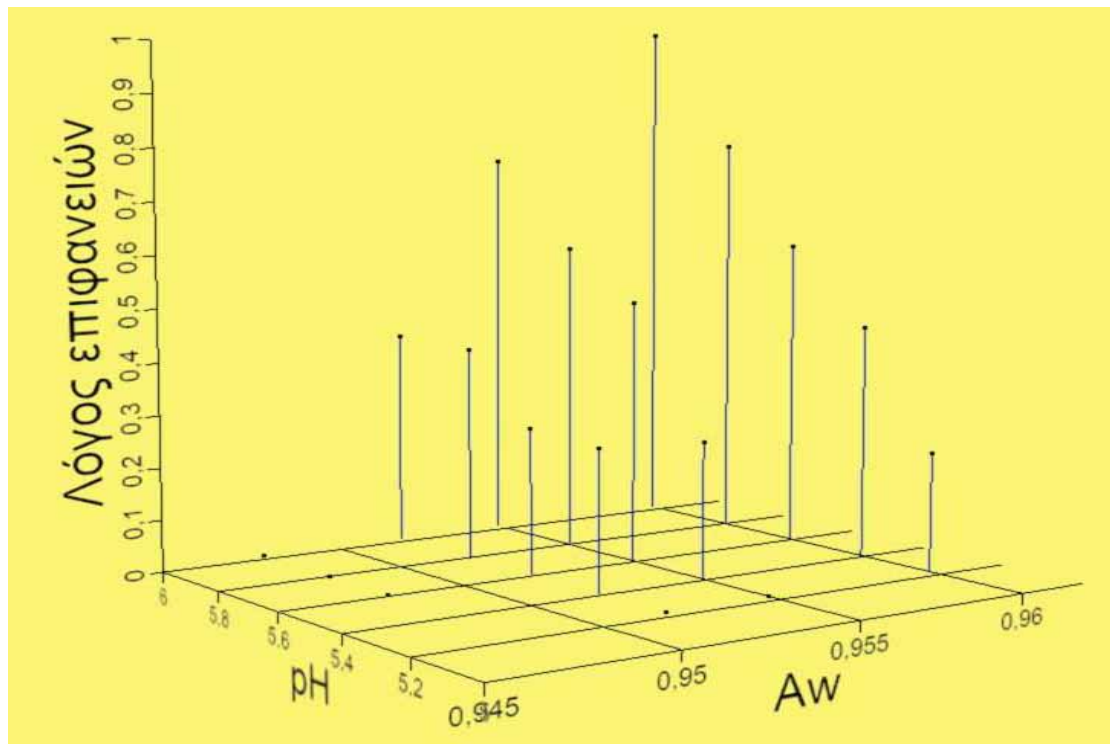
όξινα προσαρμοσμένο στέλεχος δεν αναπτύχθηκε. Έτσι στο μεν γαλακτικό οξύ, η μέγιστη τιμή του λόγου των επιφανειών, ίση με 1, παρατηρείται στο ζεύγος τιμών pH- a_w : 6.03-0.960 και οι μικρότερες 0.28 και 0.29 στα ζεύγη τιμών 5.43-0.952 και 5.22-0.955 αντίστοιχα. Στο οξικό οξύ από την άλλη, η μέγιστη τιμή του λόγου των επιφανειών, ίση με 1, παρατηρείται επίσης στο ζεύγος τιμών pH- a_w : 6.03-0.960 και οι μικρότερες 0.23 και 0.27 στα ζεύγη τιμών 5.23-0.960 και 5.41-0.952 αντίστοιχα.



Σχήμα 7. Γραφική απεικόνιση ανάπτυξης-μη ανάπτυξης του βακτηρίου *E. coli* ATCC 25922 σε υποστρώματα με διαβάθμιση του pH και της a_w κατόπιν επίδρασης όξινης καταπόνησης. Κόκκινα σημεία = δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη στο συγκεκριμένο συνδυασμό pH - a_w
Πράσινα σημεία = παρατηρήθηκε ανάπτυξη στο συγκεκριμένο συνδυασμό pH - a_w



Σχήμα 8. Τρισδιάστατο συγκριτικό γράφημα τριών μεταβλητών (pH, a_w , λόγος επιφανειών). Απεικονίζεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *E. coli* ATCC 25922 - μετά την επίδραση όξινης καταπόνησης - σε υποστρώματα των οποίων το pH έχει ρυθμιστεί με χρήση γαλακτικού οξέος.



Σχήμα 9. Τρισδιάστατο συγκριτικό γράφημα τριών μεταβλητών (pH, a_w , λόγος επιφανειών). Απεικονίζεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *E. coli* ATCC 25922- μετά την επίδραση όξινης καταπόνησης - σε υποστρώματα των οποίων το pH έχει ρυθμιστεί με χρήση οξικού οξέος.

3.1.3. Συζήτηση

Έχει παρατηρηθεί ότι στελέχη *E. coli* καλλιεργούμενα υπό συνθήκες ήπια όξινης καταπόνησης (pH 5.5) απουσία γλυκόζης, επιζούν μετέπειτα σε ακραία όξινες τιμές pH (2.5) με ελάχιστη συγκέντρωση γλυκόζης (Castanie-Cornet et al., 1999). Αυτή η παρατήρηση δεν επιβεβαιώθηκε στην παρούσα εργασία, πράγμα που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε πιθανόν να είχε υποστεί μετάλλαξη των γονιδίων που ελέγχουν τους κύριους ρυθμιστές του πρώτου συστήματος οξεοανθεκτικότητας (AR1), τον παράγοντα σ^s , την cAMP και την πρωτεΐνη δέκτη της cAMP (CRP) (Castanie-Cornet et al., 1999). Όπως είδαμε στις παραγράφους 3.1.1. και 3.1.2., διαφοροποιήσεις κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου *E. coli* ATCC 25922 παρουσιάστηκαν τόσο μεταξύ των υποστρωμάτων ανάπτυξης – άλλοτε ρύθμιση του pH με γαλακτικό και άλλοτε με οξικό οξύ – όσο και μεταξύ του όξινα προσαρμοσμένου και του μη προσαρμοσμένου στελέχους. Τα οργανικά οξέα χρησιμοποιούνται συχνά ως πρόσθετα των τροφίμων προκειμένου να εμποδίσουν τον πολλαπλασιασμό των παθογόνων μικροοργανισμών και την αλλοίωση του προϊόντος προς επίτευξη μεγαλύτερης διάρκειας ζωής τους (Golden et al., 1995). Στην παρούσα εργασία η χρήση των οργανικών οξέων γαλακτικό και οξικό, ως ρυθμιστές του pH του υποστρώματος, είχε ως αποτέλεσμα την καλύτερη ανάπτυξη του μικροοργανισμού στο πρώτο, είτε αυτή αφορούσε σε όξινα προσαρμοσμένες καλλιέργειες, είτε σε μη προσαρμοσμένες (βλέπε παράγραφο 3.1.2.). Τα αποτελέσματα αυτά διαφέρουν από τα αποτελέσματα των Cheng et al. (2003) οι οποίοι μελετώντας την επιβίωση τριών στελεχών *E. coli* O157:H7 κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι όξινα προσαρμοσμένες καλλιέργειες σε pH 5.0 για 4h επιβίωσαν πολύ καλύτερα από εκείνες που είχαν προσαρμοστεί σε pH 3, 4 ή 5 για 1, 2 ή 6h, όταν ενοφθαλμιζόνταν σε υποστρώματα με pH 3.0 που περιείχαν είτε οξικό είτε γαλακτικό οξύ. Επιπλέον, η μείωση του πληθυσμού των τριών στελεχών ήταν μεγαλύτερη κατά την ανάπτυξη στο γαλακτικό παρά στο οξικό οξύ. Αυτές οι διαφορές που παρατηρούνται πιθανότατα οφείλονται αφενός στο στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία και στη μειωμένη οξεοανθεκτικότητά του συγκρινόμενο με το στέλεχος O157:H7 των Cheng et al. και αφετέρου στη διάρκεια της προσαρμογής των καλλιεργειών του μικροοργανισμού *E. coli* σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (περίπου 1½ h). Οι ίδιοι ερευνητές στα πειράματά τους έδειξαν επιπλέον ότι σε όλα τα στελέχη (και σε όλες τις τιμές pH) οι μη προσαρμοσμένες

καλλιέργειες επεδείκνυαν υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης από αυτές που είχαν υποστεί προσαρμογή για 1h σε pH 5.0.

Σε πρόσφατη εργασία (Skandamis et al., 2007) της προσαρμογής του στελέχους *E. coli* O157:H7 σε συνθήκες όξινης καταπόνησης, καθώς η θερμοκρασία και η ενεργότητα νερού γίνονταν πιο περιοριστικές για την ανάπτυξη ($\leq 25^{\circ}\text{C}$ και ≤ 0.981 , αντίστοιχα), το ελάχιστο pH που επέτρεπε την ανάπτυξη των μη προσαρμοσμένων σε συνθήκες όξινης καταπόνησης καλλιεργειών του βακτηρίου, ήταν ίσο ή μεγαλύτερο κατά 0.47 ή 0.51 μονάδες, συγκρινόμενο με τις προσαρμοσμένες καλλιέργειες (προσαρμογή σε TSB με προσθήκη γλυκόζης 1%). Επιπλέον, η προσαρμογή μείωσε τις τιμές ενεργότητας (σε θερμοκρασίες 10 και 15°C) νερού σε αντίθεση με τις μη προσαρμοσμένες καλλιέργειες. Τα ανωτέρω περιγραφόμενα διαφέρουν από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας όπου οι καλλιέργειες που είχαν υποστεί προσαρμογή (TSBYE pH 5.0 απουσία γλυκόζης) εμφάνιζαν υψηλότερες ελάχιστες τιμές pH και υψηλότερες τιμές a_w κατά την ανάπτυξη, από τις μη προσαρμοσμένες (βλ. Παράγραφο 3.1.1. και 3.1.2, Σχήματα 4 και 7). Αυτή η παρατηρούμενη διαφορά με την προηγούμενη μελέτη δύναται να οφείλεται και στην προσθήκη γλυκόζης (1%) η οποία ενεργοποιεί το δεύτερο και πιο αποτελεσματικό σύστημα οξεοανθεκτικότητας του βακτηρίου *E. coli* (Richard και Foster, 2003) και επάγει την οξεοανθεκτικότητα στα βακτήρια *E. coli* και *Listeria monocytogenes* (Buchanan και Edelson, 1996· Samelis et al., 2003· Berry et al., 2004). Αν και το στέλεχος *E. coli* O157:H7 διαθέτει υψηλότερου επιπέδου ανθεκτικότητα στην όξινη καταπόνηση έναντι άλλων οροτύπων, έχουν αναφερθεί παραλλαγές στην οξεοανθεκτικότητα των στελεχών (Arnold και Kasper, 1995· Miller και Kaspar, 1994· Benjamin και Datta, 1995). Επομένως το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, μπορεί να είναι λιγότερο οξεοανθεκτικό και ως εκ τούτου εξηγείται η αποτυχία προσαρμογής σε συνθήκες όξινης καταπόνησης και κατ'επέκταση επιβίωσης σε χαμηλές τιμές pH. Σε ορισμένους τώρα συνδυασμούς με ενεργότητα νερού 0.964 και 0.954 και θερμοκρασίες από $15-35^{\circ}\text{C}$ – που είναι πιο κοντά και συμφωνούν με τα δεδομένα της παρούσας εργασίας – οι καλλιέργειες που είχαν υποστεί προσαρμογή σε οξινοσμένα με γαλακτικό οξύ υγρά έκπλυσης σφαγίων απαιτούσαν ελάχιστες τιμές pH υψηλότερες κατά 0.51 και 0.98 (pH 5.04 και 6.02) από εκείνες που δεν είχαν υποστεί προσαρμογή (pH 4.52 και 5.04 αντίστοιχα) (Skandamis et al., 2007). Στη μελέτη των Tassou et al. (2009) οι καλλιέργειες του προσαρμοσμένου σε συνθήκες όξινης καταπόνησης παθογόνου, παρουσίασαν μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης από τις μη

προσαρμοσμένες μόνο στην περίπτωση της ταραμοσαλάτας (pH 4.5) χωρίς συντηρητικά, ενώ καμία διαφορά στη βιωσιμότητα (μεταξύ προσαρμοσμένων και μη) δεν παρατηρήθηκε στη μελιτζανοσαλάτα (pH 4.1) χωρίς συντηρητικά αλλά και στις δύο σαλάτες με τα συντηρητικά. Σημαντικές διαφορές δεν παρατηρήθηκαν επίσης και κατά την επιβίωση των όξινα προσαρμοσμένων ή μη προσαρμοσμένων κυττάρων του βακτηρίου *E. coli* στην ξηρά σκόνη βόειου κρέατος κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (Ryu et al., 1999) ενώ οι Calicioglou et al. (2003b) βρήκαν ότι η όξινη προσαρμογή του μικροοργανισμού *E. coli* ενίσχυε την αδρανοποίηση του παθογόνου κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης μαριναρισμένων βόειων προϊόντων κρέατος.

Σε ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα, οι καλλιέργειες *E. coli* που είχαν υποστεί προσαρμογή σε συνθήκες όξινης καταπόνησης καθώς και αυτές που δεν είχαν υποστεί προσαρμογή δεν μπόρεσαν να αντέξουν το περιβάλλον σταδιακά μειούμενου pH (pH 5.6 έως 4.0) και με την πάροδο 3 ημερών στους 7°C είχαν εξαλειφθεί (Dlamini και Buys, 2008). Στο ίδιο προϊόν, αλλά σε τιμές pH από 5.6 έως 4.4, το στέλεχος που δεν είχε υποστεί προτέρα προσαρμογή επιβίωσε καλύτερα από το προσαρμοσμένο στέλεχος (Dlamini και Buys, 2008). Οι Cheng Hsin-Yi και Cheng-Chun Chou (2001) παρατήρησαν επίσης ότι οι προσαρμοσμένοι σε συνθήκες όξινης καταπόνησης πληθυσμοί *E. coli* O157:H7 ήταν λιγότερο ανθεκτικοί σε μια ομάδα ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων (με επικρατούσες συνθήκες κατά την ανάπτυξη: pH 3.6 και 3.9, θερμοκρασία 7°C) σε σύγκριση με τους μη προσαρμοσμένους, ενώ αντίθετα παρουσίασαν αυξημένη ανθεκτικότητα και κατ'επέκταση επιβίωση (έναντι των μη προσαρμοσμένων) σε χυμούς σπαραγγιού και μάνγκο (pH 3.6 και 3.2 αντίστοιχα) στους 7° και 25°C – με την ανάπτυξη σε θερμοκρασία 25°C να υστερεί έναντι αυτής στους 7°C. Από πειράματα που πραγματοποίησαν οι Lindqvist και Lindblad (2009) με ανάπτυξη του βακτηρίου *E. coli* σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες 8°, 15° και 20°C και λοιπές συνθήκες περίπου όμοιες με αυτές της παρούσας εργασίας (ανάπτυξη σε BHI broth με pH 4.6 ρυθμισμένο με γαλακτικό οξύ και a_w 0.93-0.94 κατόπιν προσαρμογής του βακτηρίου σε συνθήκες όξινης καταπόνησης με χρήση TSB με 1% γλυκόζη), φάνηκε για μια ακόμη φορά η αδυναμία του να αναπτυχθεί εξίσου καλά σε υψηλότερη θερμοκρασία (20°C) όπως σε χαμηλότερες (8 και 15°C). Βάσει των όσων προαναφέρθηκαν και της εργασίας των Skandamis et al. (2007) μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι όταν ένα εμπόδιο είναι ήπιο ($a_w > 0.981$ ή θερμοκρασία $> 15^\circ\text{C}$), η όξινη προσαρμογή πιθανότατα να μην έχει επιπτώσεις στα όρια ανάπτυξης/μη ανάπτυξης του

μικροοργανισμού *E. coli*. Αντίθετα, καθώς η θερμοκρασία και η ενεργότητα νερού γίνονται πιο ανασταλτικές για την ανάπτυξη, εκεί είναι που η προσαρμογή σε συνθήκες όξινης καταπόνησης επιτρέπει στα κύτταρα να αναπτυχθούν σε χαμηλότερες τιμές a_w και pH. Οι απαιτήσεις σε ενέργεια των μικροβιακών κυττάρων προκειμένου να υπερνικήσουν τα εμπόδια του pH, a_w και θερμοκρασίας ακολουθούν την ακόλουθη διάταξη: $pH > a_w \geq \text{θερμοκρασία}$ (McMeekin et al., 2002· Shadbolt et al., 2001· McMeekin et al., 2000).

3.1.4. Επίδραση στο πρωτέωμα

Η επίδραση της προσαρμογής σε συνθήκες όξινης καταπόνησης επί του πρωτεώματος του στελέχους *E. coli* ATCC 25922, αξιολογήθηκε με χρήση ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμιδίου δύο διαστάσεων (2D GE) (παράγραφος 2.4.9.3.) σε συνδυασμό με το λογισμικό ηλεκτρονικού υπολογιστή PDQuest Advanced 8.0.1 (BIO-RAD) και τη βοήθεια σαρωτή-μετρητή οπτικής πυκνότητας πηκτών πολυακρυλαμιδίου (GS 800 Calibrated Densitometer, BIO-RAD).

3.1.4.1. Δείκτης μοριακών βαρών και αποτύπωση πρωτεϊνικής σύστασης

Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 2.4.9.4. για την εκτίμηση του μοριακού βάρους των διαχωριζόμενων πρωτεϊνικών στιγμάτων και το μετέπειτα ποιοτικό προσδιορισμό των αντιστοιχουσών σ'αυτά πρωτεϊνών του στελέχους *E. coli* ATCC 25922, χρησιμοποιείται ένα μείγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, το οποίο αποκαλείται δείκτης μοριακών βαρών ή size marker. Στην πειραματική διαδικασία της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης μοριακών βαρών Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range της BIO-RAD, ο οποίος περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες του Πίνακα 15.

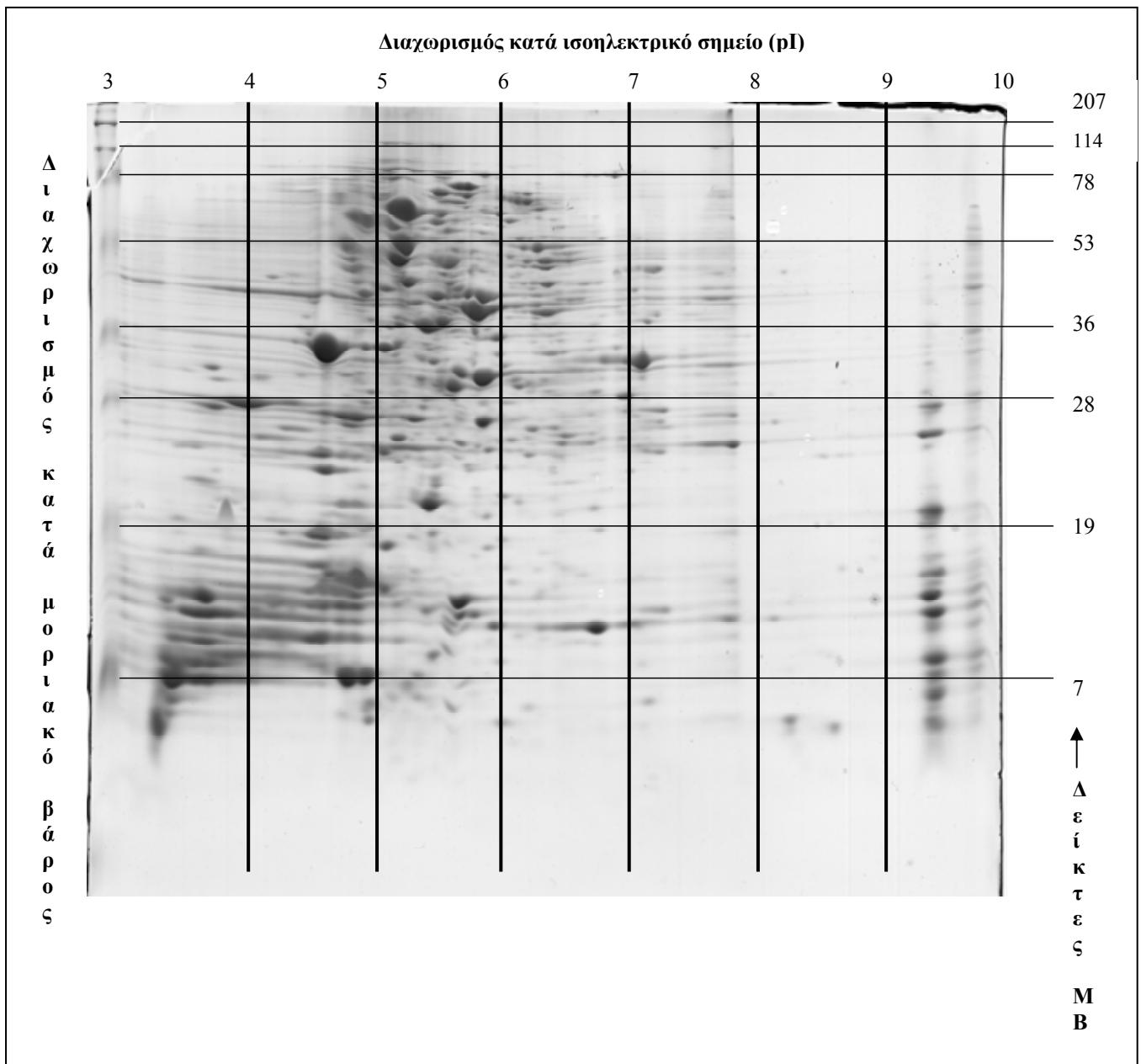
Πίνακας 15: Σύσταση δείκτη μοριακών βαρών Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range (BIO-RAD)

ΠΡΩΤΕΪΝΗ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΜΟΡΙΑΚΟ ΒΑΡΟΣ (kDa)
Μυοσίνη	Σκελετικός μύς κουνελιού	207.345
β-γαλακτοζιδαση	<i>E. coli</i>	114.363
Βόεια αλβουμίνη ορού	Πλάσμα αίματος βοός	78.444
Οβαλβουμίνη	Ασπράδι αυγού	53.086
Ανθρακική ανυδράση	Ερυθροκύτταρα βοός	35.719
Παρεμποδιστής τρυψίνης σόγιας	Σόγια	28.329
Λυσοζύμη	Ασπράδι αυγού	19.325
Απροτινίνη	Πάγκρεας βοός	6.973

Τα πρωτεϊνικά μόρια που απαρτίζουν το δείκτη μοριακών βαρών είναι απλές πρωτεΐνες (μυοσίνη, βόεια αλβουμίνη ορού και οβαλβουμίνη), πρωτεϊνικοί παρεμποδιστές ενζύμων (παρεμποδιστής τρυψίνης σόγιας και απροτινίνη) και ένζυμα (β-γαλακτοζιδαση, ανθρακική ανυδράση και λυσοζύμη). Το μικρού μοριακού βάρους πρωτεϊνικό μόριο της απροτινίνης, λόγω και της σύστασης της πηκτής

πολυακρυλαμιδίου σε μονομερές και bis-ακρυλαμίδιο, εμφανίζεται πάνω στο μέτωπο της ηλεκτροφόρησης. Με το πέρας της διαδικασίας ακολουθεί χρώση και μετέπειτα αποχρωματισμός των πηκτών πολυακρυλαμιδίου, προκειμένου να γίνει εμφάνιση και αποτύπωση αντίστοιχα της πρωτεϊνικής σύστασης του μικροοργανισμού *E. coli* ATCC 25922 με τη μορφή πρωτεϊνικού «χάρτη» για τις συνθήκες όξινης προσαρμογής (αλλά και μη προσαρμογής) στις οποίες υπεβλήθη.

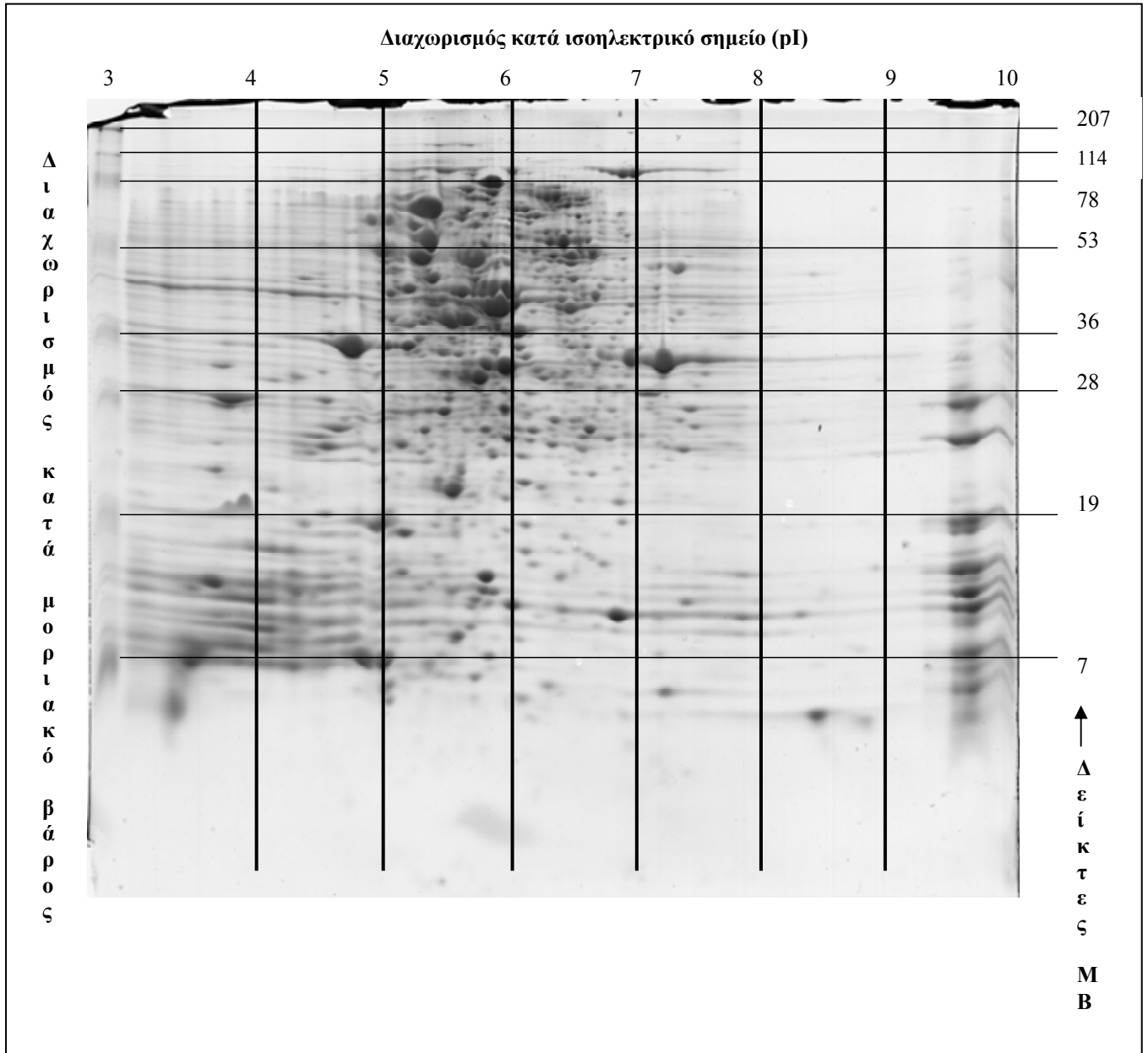
3.1.4.2. Πρωτεϊνική κατατομή σε συνθήκες μη προσαρμογής



Σχήμα 10. Επίδραση συνθηκών μη προσαρμογής (pH 7.0) στο πρωτέωμα του βακτηρίου *E. coli* ATCC 25922 μετά από ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου δύο διαστάσεων.

Στο Σχήμα 10 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της 2D SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης των εν μέσω λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης, κυττάρων του στελέχους *E. coli* ATCC 25922, χωρίς προηγουμένως να έχουν υποστεί προσαρμογή σε συνθήκες όξινης καταπόνησης.

3.1.4.3. Πρωτεϊνική κατατομή σε συνθήκες όξινης προσαρμογής

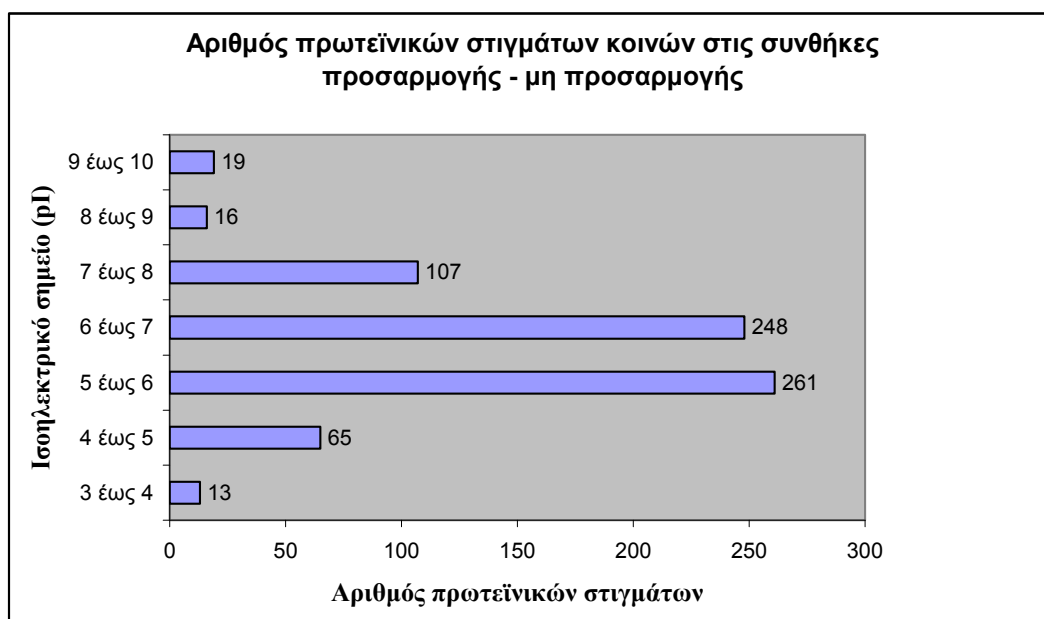


Σχήμα 11. Επίδραση συνθηκών όξινης προσαρμογής (pH 5.0) στο πρωτέωμα του βακτηρίου *E. coli* ATCC 25922 μετά από ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδιου δύο διαστάσεων.

Μετά την προσαρμογή του στελέχους *E. coli* ATCC 25922 σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (pH 5.0), η πρωτεϊνική κατατομή (πρωτέωμα) του βακτηρίου παρουσιάζει την εικόνα του Σχήματος 11.

3.1.4.4. Σύγκριση μεταξύ συνθηκών προσαρμογής και μη προσαρμογής και ταυτοποίηση πρωτεϊνών

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων που λαμβάνουμε από τις ηλεκτροφορήσεις δύο διαστάσεων και ο προσδιορισμός τυχόν ομοιοτήτων αλλά και διαφορών στην εμφάνιση ή μη ορισμένων πρωτεϊνικών στιγμάτων (δηλαδή πρωτεϊνών), μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών (προσαρμογής σε συνθήκες όξινης καταπόνησης και μη προσαρμογής), πραγματοποιείται όπως προαναφέρθηκε, με σάρωση και ταυτόχρονη επεξεργασία των αποτυπωμένων επί των πηκτών της ηλεκτροφόρησης πρωτεωμάτων, με το λογισμικό (software) PDQuest Advanced 8.0.1 της BIO-RAD. Ο εντοπισμός ομοιοτήτων ή διαφορών έγκειται στην εύρεση πρωτεϊνικών στιγμάτων κοινά απαντώμενων τόσο σε συνθήκες προσαρμογής όσο και μη προσαρμογής, αλλά και στην εύρεση πρωτεϊνικών στιγμάτων που εμφανίζονται μόνο σε μια εκ των δύο περιπτώσεων. Τα κοινά πρωτεϊνικά στίγματα που εμφανίστηκαν στις περιπτώσεις προσαρμογής και μη προσαρμογής καταμετρήθηκαν και παρουσιάζονται στο ραβδόγραμμα του Σχήματος 12.



Σχήμα 12. Αριθμός κοινών πρωτεϊνικών στιγμάτων (των συνθηκών προσαρμογής – μη προσαρμογής του στελέχους *E. coli* ATCC 25922) που αντιστοιχούν σε ένα εύρος τιμών ισοηλεκτρικού σημείου (pI) και προέκυψαν μετά από επεξεργασία με το λογισμικό PDQuest Advanced 8.0.1 της BIO-RAD.

Αναλυτική παρουσίαση θα ακολουθήσει μόνο για εκείνα τα στίγματα και τις αντιστοιχούσες σ'αυτά πρωτεΐνες, που εμφανίστηκαν είτε στην περίπτωση προσαρμογής σε συνθήκες ήπια όξινης καταπόνησης είτε μη προσαρμογής.

Όταν μια πρωτεΐνη εντοπιστεί και αποτυπωθεί επάνω στην πηκτή της ηλεκτροφόρησης με τη μορφή στίγματος (spot), επόμενο βήμα είναι η εμφάνιση και ο χαρακτηρισμός αυτού του στίγματος. Οι παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο σ'αυτή τη διαδικασία είναι το μέγεθος και η ένταση του αποτυπωμένου στίγματος. Έντονα και μεγάλοι μεγέθους στίγματα υποδηλώνουν παρουσία μεγάλης ποσότητας πρωτεΐνης εν αντιθέσει με τα μικρά και αμυδρά, τα οποία υποδηλώνουν μικρές ποσότητες πρωτεΐνης. Το πόσο έντονα όμως θα εμφανιστεί ένα πρωτεϊνικό στίγμα εξαρτάται από την ποσότητα δεσμευμένης χρωστικής επί της πρωτεΐνης, ενώ κάθε πρωτεΐνη δεσμεύει διαφορετική ποσότητα χρωστικής, κάτι το οποίο οδηγεί στην παρατηρούμενη ποικιλομορφία. Επιπροσθέτως, ένα μεγάλο πρωτεϊνικό στίγμα δύναται να υποδεικνύει την παρουσία ταυτόχρονα μιας ή περισσοτέρων πρωτεϊνών, με μικρές διαφορές στα μοριακά τους βάρη.

Κάθε ένα από τα εμφανισθέντα πρωτεϊνικά στίγματα επί της πηκτής της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων, αντιστοιχεί όπως αναφέρθηκε σε μια ή περισσότερες πρωτεΐνες, με γνωστά στοιχεία το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) και το μοριακό βάρος (σε kDa) – οριζόντιος και κάθετος άξονας αντίστοιχα των σχημάτων 10 και 11 – του κάθε στίγματος. Ο ποιοτικός προσδιορισμός των στιγμάτων που προέκυψαν, πραγματοποιήθηκε με αναζήτηση των αντιστοιχουσών πρωτεϊνών στην ηλεκτρονική βάση δεδομένων EXPASY (<http://ca.expasy.org/tools/tagident.html>) στην οποία βρίσκεται καταχωρημένος ένας μεγάλος όγκος αναγνωρισθέντων πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα της αναζήτησης φαίνονται στους Πίνακες 16 και 17.

Πίνακας 16. Αποτελέσματα αναζήτησης στη βάση δεδομένων EXPASY για τον ποιοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών προερχόμενων από πρωτεϊνικά στίγματα, κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου *E. coli* ATCC 25922 σε συνθήκες μη προσαρμογής (pH 7.0).

Κωδικός στίγματος	Στοιχεία στίγματος		Πιθανές πρωτεΐνες	Γονίδιο
	Μοριακό βάρος (kDa)	Ισοηλεκτρικό σημείο (pI)		
1243	17.61	3.63	Μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη yjgD	yjgD
1441	30.48	3.76	Πρωτεΐνη πλευρικού μαστιγίου 3	lfgL
1249	22.52	3.78	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	-

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1250	20.43	3.81	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	-
1255	18.30	3.87	Πρωτεΐνη YfdA	ORF
1257	20.30	3.94	Φλαβοντοξίνη	-
2227	19.28	4.28	Μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη matB Θεωρούμενη πρωτεΐνη μαστιγίου	matB ORF
2234	18.45	4.61	Ριβοσωμικός παράγων ωρίμανσης rimM Πρωτεΐνη απαραίτητη για το 16S rRNA	rimM rimM
2237	22.52	4.63	Αμινογλυκοσιδική (6') N-ακετυλο- τρανσφεράση AAC (6')-II Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	AacA4 ORF
2238	16.28	4.68	Πρωτεΐνη fliT διπλού ρόλου: μεταγραφής οπερονίου μαστιγίων τάξης 2 και χαπερόνιο εξαγωγής της πρωτεΐνης fliD Πρωτεΐνη ORF11	fliT ORF
2242	20.52	4.82	Θεωρούμενος παράγοντας ωρίμανσης 16S rRNA rimN Θεωρούμενη δομική πρωτεΐνη μαστιγίων	rimN -
3202	20.59	4.93	Πρωτεΐνη yciE Πρωτεΐνη GpU	yciE ORF
3239	22.56	5.32	Θυμιδυλική κινάση Θεωρούμενη πρωτεΐνη φάγου	tmk ORF
7420	31.17	6.95	Μεταγραφικός ρυθμιστής IciR	ORF
8324	25.99	8.01	Πρωτεΐνη ρύθμισης αναβολισμού ψευδαργύρου	yjbK
8237	18.05	8.04	Λιποπρωτεΐνη εξωτερικής μεμβράνης	rlpB
8325	23.45	8.04	Πρωτεΐνη traJ ρύθμισης γονιδίων μεταφοράς DNA μεταξύ βακτηριακών κυττάρων Πρωτεΐνη NnaD	traJ nnaD

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πίνακας 17. Αποτελέσματα αναζήτησης στη βάση δεδομένων EXPASY για τον ποιοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών προερχόμενων από πρωτεϊνικά στίγματα, μετά από προσαρμογή του βακτηρίου *E. coli* ATCC 25922 σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (pH 5.0).

Κωδικός στίγματος	Στοιχεία στίγματος		Πιθανές πρωτεΐνες	Γονίδιο
	Μοριακό βάρος (kDa)	Ισοηλεκτρικό σημείο (pI)		
1421	32.45	3.51	Πρωτεΐνη πλευρικού μαστιγίου 3	-
1217	19.58	3.75	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	ORF
1428	39.52	3.95	Βασική πρωτεΐνη FlaE μαστιγίου κυρίου σώματος	-
2314	23.14	4.40	Θεωρούμενη πρωτεΐνη μαστιγίου	ORF
2315	24.31	4.47	Θεωρούμενη πρωτεΐνη εξωτερικής μεμβράνης yiaT Πρωτεΐνη G πιθανώς συγγενής με ουρά φάγου	yiaT ynaC
2213	19.15	4.53	Πρωτεΐνη βιογένεσης Fe/S nfuA που λειτουργεί και ως χαπερόνιο για κατεστραμμένες Fe/S πρωτεΐνες Πρωτεΐνη GntY πρόσδεσης υπομονάδων Fe/S	nfuA gntY
2123	13.00	4.70	Πρωτεΐνη tusC επεξεργασίας του tRNA tRNA/tRNA μεθυλοτρανσφεράση YfiF	tusC YfiF
4401	37.83	5.40	Πρωτεΐνη ενεργοποίησης μηχανισμού μαστιγίων fliM Πρωτεΐνη yddR μεταφορέας ABC εσωτερικής μεμβράνης	fliM -
4101	13.22	5.44	Πρωτεΐνη HicB	-
4112	12.64	5.73	Πρωτεΐνη τύπου HIT hinT Ένζυμο φωσφοραμιδάση νουκλεοζιτών πουρίνης	hinT hinT
5207	17.31	5.96	Θεωρούμενη πρωτεΐνη BfpU Μεταγραφικός ρυθμιστής τύπου HTH zntR	ORF zntR
5223	17.21	6.33	Πρωτεΐνη CshD	cshD
6305	27.05	6.52	UPF0053 πρωτεΐνη εσωτερικής μεμβράνης ygdQ	ygdQ
6614	74.96	6.66	Πρωτεΐνη εσωτερικής μεμβράνης δεσμευμένου ATP και εισαγωγής	gsiA

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

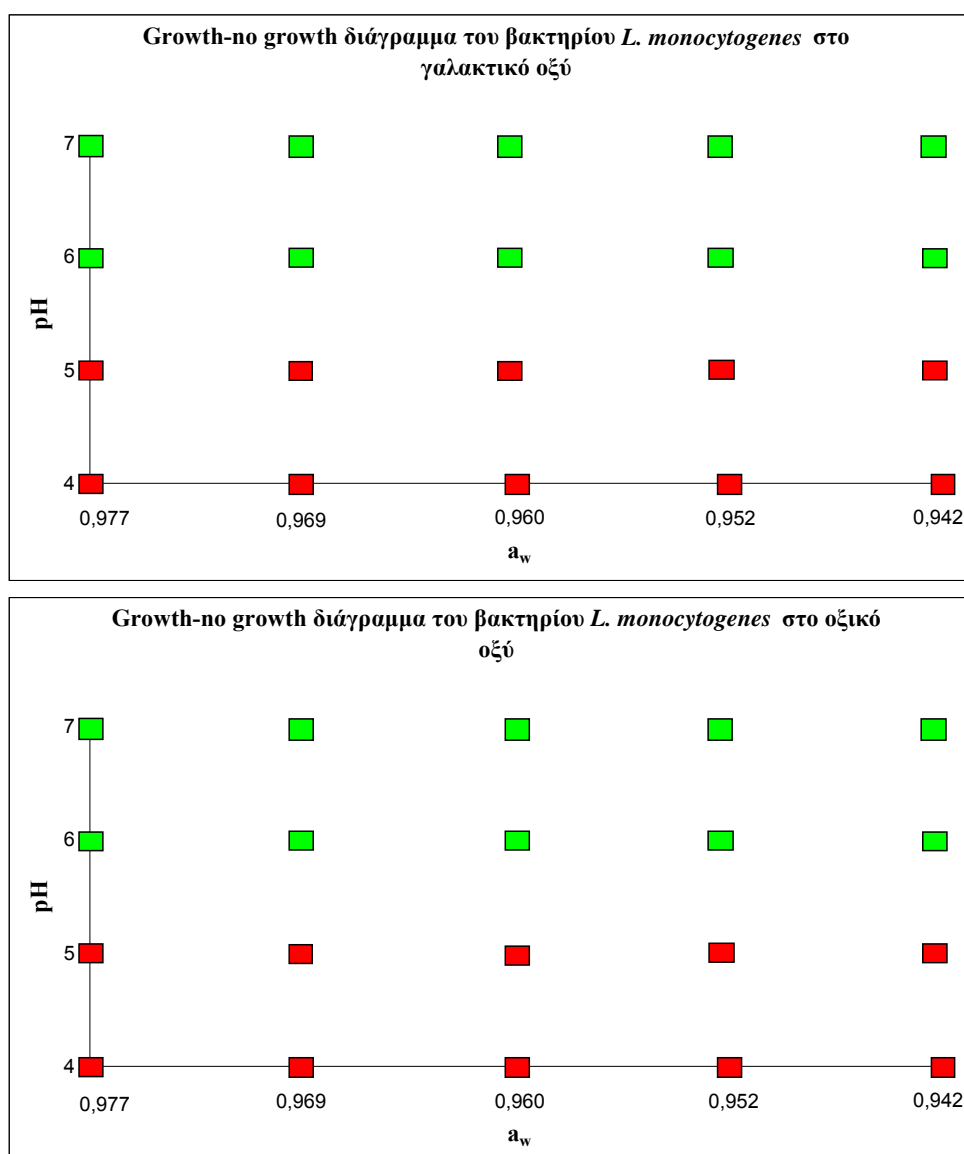
			γλουταθειόνης gsiA	
6518	46.93	6.69	Μεταφορέας γλυκονικού οξέος υψηλής συγγένειας Φωσφατάση AppA	gntP appA
6726	103.97	6.74	Πρωτεΐνη J εξειδίκευσης στον ξενιστή	ORF
6318	27.07	6.74	Πεπτιδύλο-προλυλο cis-trans FKBP περιπλασμική ισομεράση fkpA αναδίπλωσης πρωτεϊνών Ενούλο-CoA υδρατάση PaaF	fkpA paaF
6618	62.00	6.75	Πιθανή οξειδοαναγωγή μηλικού:κινόνης για το μεταβολισμό των υδατανθράκων Οξειδοαναγωγή διαμεμβρανική ανταλλαγής θειώλης:δισουλφιδίου DsbD	Mqo dsbD
6219	17.97	6.79	Απαμινάση (υδρολάση) αδενοσίνης του tRNA F 1C υπομονάδα τριχιδίων	tadA focF
6624	73.16	6.88	Θεωρούμενη πρωτεΐνη ενσωμάτωσης DNA	-
6625	69.66	6.89	DNA ελικίαση εξαρτώμενη από το ATP (ανασυνδυασμός DNA και επιδιόρθωση κατεστραμμένου DNA)	recQ
6738	103.43	6.93	Θεωρούμενη ρηλαξίαση/νουκλεάση κινητοποίησης	-
6006	10.28	6.94	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη RNA χαπερόνιο Hfq σύνδεσης ρυθμιστικών sRNA και mRNA και ένωσης με tRNA σε περιπτώσεις περιβαλλοντικού στρες.	- hfq
6115	14.90	6.94	Εστεράση ydiI (υδρολάση)	ydiI
7001	9.39	6.98	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	-
7402	37.19	7.00	Θεωρούμενη μονάδα φωσφοτρανσακετυλάσης	eutI
7415	28.50	7.53	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	-
7117	15.25	7.55	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη yfdO (πιθανόν υπεύθυνη για σύνθεση νέων μονάδων DNA)	yfdO
8208	16.21	8.98	Θεωρούμενη τρσνσποζίαση ή μεταθετάση (επι τόπου ανασυνδυασμός του DNA)	orf131

Από τη μελέτη των πινάκων 16 και 17 που παρατίθενται ανωτέρω, γίνεται εμφανές ότι υπάρχουν ομοιότητες αλλά και διαφορές όσον αφορά στο πρωτέωμα του στελέχους *E. coli* ATCC 25922 μεταξύ των συνθηκών προσαρμογής στην όξινη καταπόνηση και των συνθηκών μη προσαρμογής. Συγκεκριμένα ομοιότητες παρατηρούνται μεταξύ των δύο διαφορετικών συνθηκών, στην έκφραση διαφόρων δομικών πρωτεϊνών π.χ. πρωτεϊνών των μαστιγίων που προσδίδουν κινητικότητα στο βακτήριο και πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης του κυττάρου. Από την άλλη, στην περίπτωση των συνθηκών προσαρμογής (Πίνακας 17) το πρωτέωμα απαρτίζεται από ένα μεγάλο αριθμό ενζύμων (που δεν είχαν κωδικοποιηθεί στην περίπτωση μη προσαρμογής), γεγονός που πιθανότατα υποδηλώνει εμπλοκή τους σε διάφορες περαιτέρω μεταβολικές διεργασίες σχετιζόμενες με έκφραση γονιδίων και επαγωγή πρωτεϊνών. Εκ των ενζύμων αυτών κάποια σχετίζονται με την επιδιόρθωση του κατεστραμμένου DNA (DNA ελικάση κωδικοποιούμενη από το γονίδιο *recQ*), τη σύνθεση νέων μονάδων DNA και την κατάλυση μετάθεσης στοιχείων όπως τα τρανσποζόνια (αλληλουχίες DNA που μπορούν να μετακινούνται σε διαφορετικές θέσεις) από ένα σημείο του κυττάρου σε ένα άλλο με συνακόλουθο ανασυνδυασμό του DNA (μεταθετάση κωδικοποιούμενη από το *orf131* γονίδιο). Όλα τα προαναφερθέντα φαίνεται να συμφωνούν με την περιγραφή των Salaun et al. (2003) κατά τους οποίους κάποιοι μικροοργανισμοί όπως π.χ. *Escherichia coli* και *Salmonella* spp., χρησιμοποιούν κυρίως μηχανισμούς ανασυνδυασμού του γονιδιώματός τους για να προσαρμοστούν στα ευμετάβλητα στρεσογόνα περιβάλλοντα ανάπτυξης. Επιπλέον η ύπαρξη στο πρωτέωμα του RNA χαπερονίου Hfq (κωδικοποιούμενου από το γονίδιο *hfq*), το οποίο συνδέει μικρά ρυθμιστικά μόρια RNA (sRNAs) και mRNA για ρύθμιση της μεταφραστικής διαδικασίας και απόκριση σε συνθήκες περιβαλλοντικής καταπόνησης, υποδηλώνει για μια ακόμη φορά την προσπάθεια εκ μέρους του στελέχους *E. coli* ATCC 25922 να προσαρμοστεί στις συνθήκες όξινης καταπόνησης στις οποίες εκτίθεται.

3.2. Επίδραση των πειραματικών συνθηκών επί του στελέχους *Listeria monocytogenes* LQC 15015

3.2.1. Ανάπτυξη του στελέχους *Listeria monocytogenes* LQC 15015

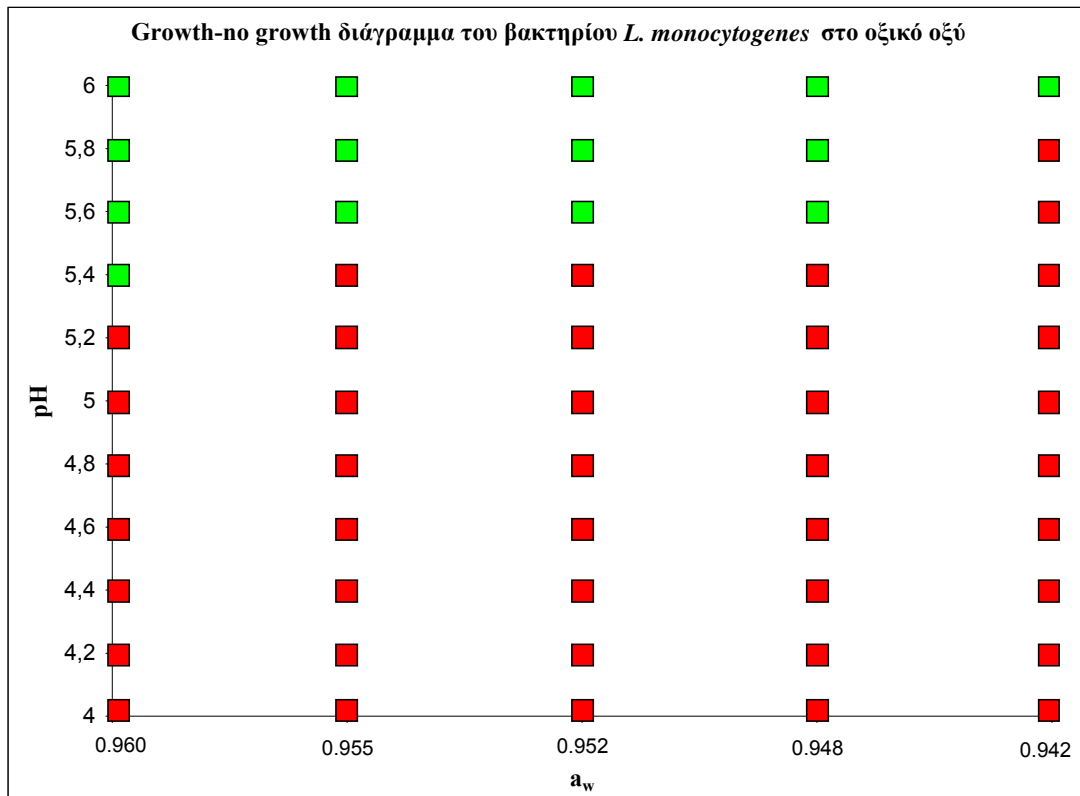
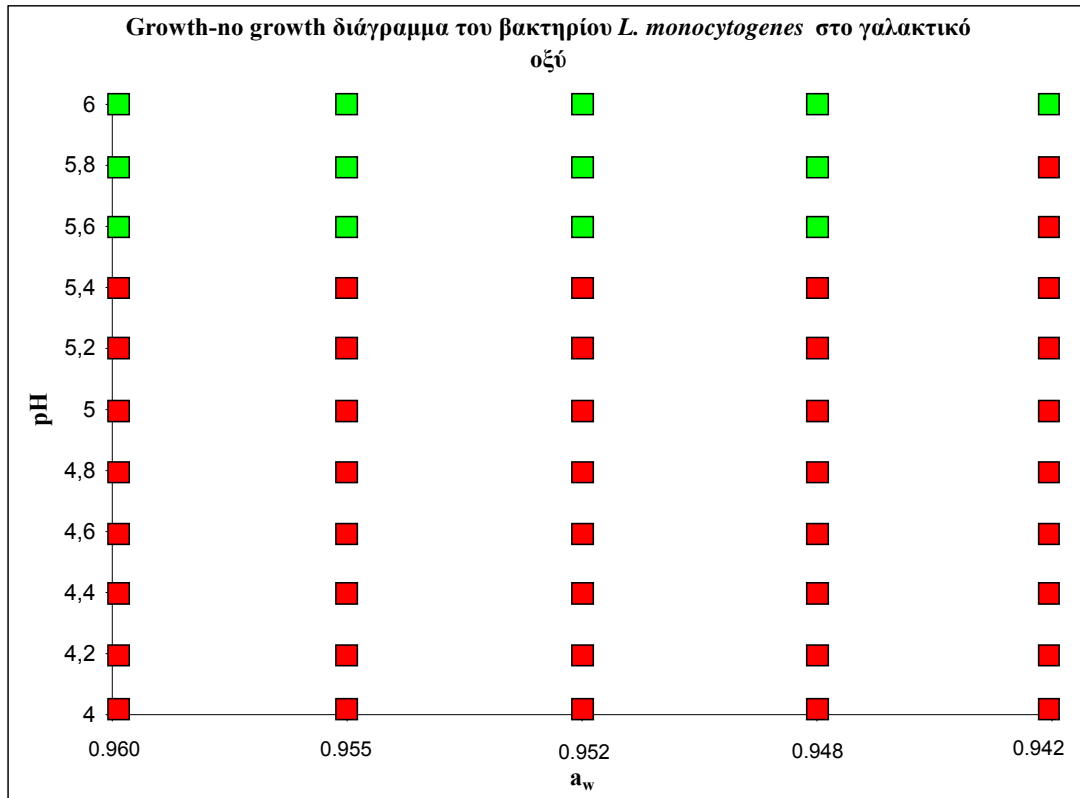
Όλα όσα αναφέρθηκαν στην παράγραφο 3.1.1. περί συνθηκών ανάπτυξης του μικροοργανισμού *E. coli* ATCC 25922 ισχύουν αυτούσια και στην περίπτωση της ανάπτυξης του στελέχους *Listeria monocytogenes* LQC 15015. Έτσι για μια ακόμη φορά οι συνδυασμοί pH και ενεργότητας νερού των υποστρωμάτων στα οποία ενοφθαλμίστηκε το βακτήριο φαίνονται στον Πίνακα 14 της παραγράφου 3.1.1.



Σχήμα 13. Γραφική απεικόνιση ανάπτυξης-μη ανάπτυξης του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* LQC 15015 σε υποστρώματα με διαβάθμιση του pH και της a_w (προκαταρκτικό πείραμα).
 Κόκκινα σημεία = δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη στο συγκεκριμένο συνδυασμό pH - a_w
 Πράσινα σημεία = παρατηρήθηκε ανάπτυξη στο συγκεκριμένο συνδυασμό pH - a_w

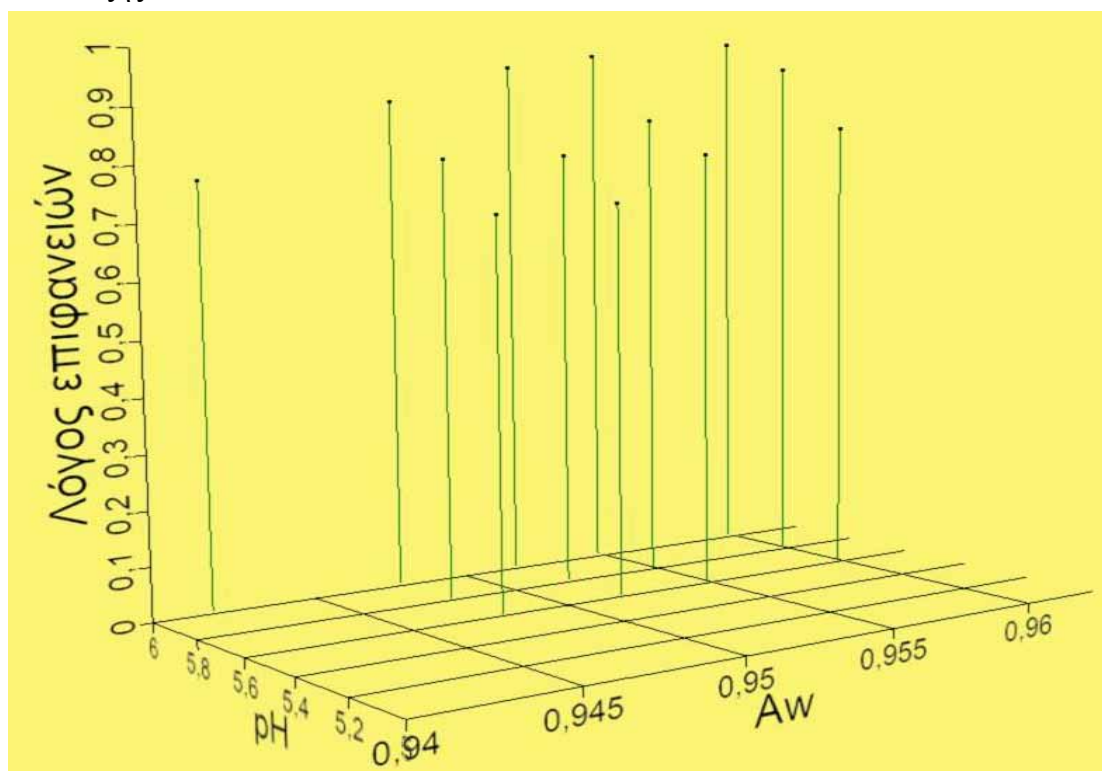
Από την ανάπτυξη ή μη του μικροοργανισμού στα υποστρώματα του Πίνακα 14 (προκαταρκτικό πείραμα) προκύπτουν τα αποτελέσματα του Σχήματος 13 (απεικόνιση ανάπτυξης–μη ανάπτυξης/growth–no growth interface). Από το σχήμα γίνεται φανερό ότι όσον αφορά στο προκαταρκτικό πείραμα ευρέων ορίων δεν παρατηρούνται διαφορές στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού, είτε χρησιμοποιείται ως μέσο ρύθμισης του pH του υποστρώματος το γαλακτικό οξύ είτε χρησιμοποιείται το οξικό οξύ, αφού και στις δύο περιπτώσεις ανάπτυξη παρατηρείται σε τιμές pH από 6 έως και 7 και σε ενεργότητες νερού από 0.977 έως και 0.942, καθιστώντας έτσι το βακτήριο λιγότερο ανθεκτικό σε χαμηλές τιμές pH συγκριτικά με το στέλεχος *E. coli* ATCC 25922. Όπως και στην περίπτωση του μικροοργανισμού *E. coli* έτσι και με το στέλεχος *Listeria monocytogenes* LQC 15015 το προκαταρκτικό πείραμα δεν είναι ικανό από μόνο του να δώσει πλήρη εικόνα του εύρους ανάπτυξης του μικροοργανισμού, οπότε θα μελετηθεί σε ένα στενότερο εύρος τιμών pH και a_w (Πίνακας 14 παρ. 3.1.1). Η απεικόνιση της ανάπτυξης–μη ανάπτυξης (growth–no growth interface) του στελέχους *Listeria monocytogenes* LQC 15015 στο νέο εύρος τιμών pH και ενεργότητας νερού παρουσιάζεται στο Σχήμα 14.

Η μειωμένη ανθεκτικότητα του στελέχους *Listeria monocytogenes* LQC 15015 που παρατηρήθηκε (συγκριτικά με το στέλεχος *E. coli*) επιβεβαιώνεται και από το πείραμα στενότερων ορίων. Ο μικροοργανισμός φαίνεται να υφίσταται τη θανατηφόρο επίδραση του γαλακτικού οξέος, σε τιμές pH από 4.02 έως και 5.43, ανεξαρτήτως της ενεργότητας νερού που επικρατεί. Σε τιμές pH 5.62 και 5.82 η ανάπτυξη σταματά σε ενεργότητα νερού 0.948, ενώ σε pH 6.03 η ανάπτυξη καθίσταται δυνατή και σε πιο χαμηλή ενεργότητα νερού (0.942). Πανομοιότυπη είναι η εικόνα που επικρατεί στην περίπτωση που γίνεται χρήση οξικού οξέος ως μέσου ρύθμισης του pH του υποστρώματος, με τη μόνη διαφορά ότι το στέλεχος αναπτύσσεται επιπλέον και στο ζεύγος τιμών pH- a_w : 5.41-0.960 πράγμα που σημαίνει ότι η ανεκτικότητά του σε αυτό το οξύ είναι μεγαλύτερη απ'ότι στο γαλακτικό. Κατ'επέκταση λοιπόν, σε τιμές pH 5.61 και 5.80 η ανάπτυξη σταματά και πάλι σε a_w 0.948, ενώ σε pH 6.03 η μικρότερη τιμή ενεργότητας νερού στην οποία ο μικροοργανισμός εμφανίζει ανάπτυξη, είναι 0.942.

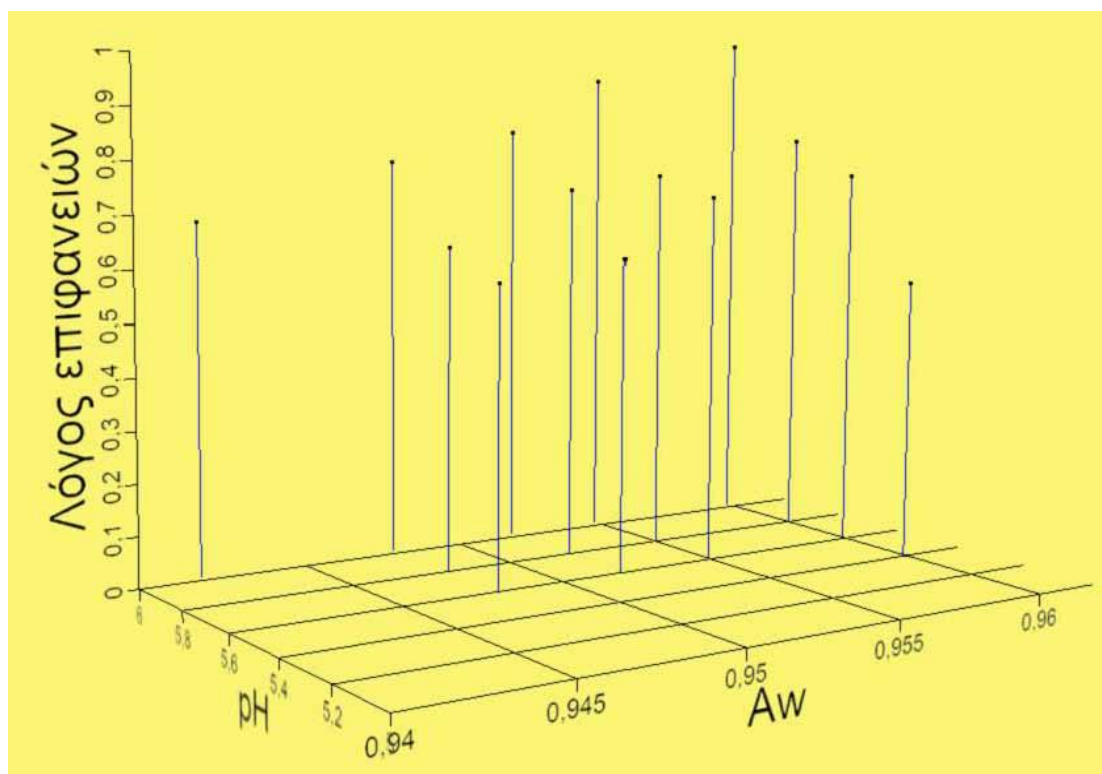


Σχήμα 14. Γραφική απεικόνιση ανάπτυξης-μη ανάπτυξης του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* LQC 15015 σε υποστρώματα με διαβάθμιση του pH και της a_w (πείραμα στενότερων ορίων ανάπτυξης).
 Κόκκινα σημεία = δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη στο συγκεκριμένο συνδυασμό pH - a_w
 Πράσινα σημεία = παρατηρήθηκε ανάπτυξη στο συγκεκριμένο συνδυασμό pH - a_w

Καλύτερη απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους *Listeria monocytogenes* LQC 15015 παρέχεται στα τρισδιάστατα γραφήματα των σχημάτων 15 και 16 (γαλακτικό και οξικό οξύ αντίστοιχα). Κοινή παρατήρηση και στα δύο σχήματα είναι ότι όσο αυξάνονται οι τιμές pH και a_w τόσο αυξάνεται και ο λόγος των επιφανειών και τόσο περισσότερο οι συνθήκες ανάπτυξης προσεγγίζουν την άριστη. Όπως εξάλλου ειπώθηκε ήδη, ο λόγος των επιφανειών αποτελεί ένα μέτρο σύγκρισης της ανάπτυξης του βακτηρίου σε κάθε ένα συνδυασμό pH- a_w με το συνδυασμό εκείνο που οδηγεί στη βέλτιστη ανάπτυξη. Έτσι τόσο στο γαλακτικό οξύ όσο και στο οξικό η μέγιστη τιμή του λόγου των επιφανειών (ίση με 1) εμφανίζεται σε τιμή pH 6.03 και ενεργότητα νερού 0.960 (συνδυασμός βέλτιστης ανάπτυξης). Αντίθετα η μικρότερη τιμή του λόγου στο γαλακτικό οξύ, εντοπίζεται στο ζεύγος τιμών pH- a_w : 5.62-0.948 και είναι ίση με 0.71, ενώ στο οξικό οξύ εντοπίζεται στο ζεύγος pH- a_w : 5.41-0.960 και είναι ίση με 0.55. Με ευκολία εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι λόγοι των επιφανειών και στα δύο οργανικά οξέα κυμαίνονται σε πολύ υψηλά επίπεδα (άνω του 0.70 και 0.55 στο γαλακτικό και οξικό οξύ αντίστοιχα), με το γαλακτικό οξύ να υπερτερεί έναντι του οξικού. Αυτό σημαίνει ότι όλο και περισσότεροι συνδυασμοί pH- a_w σε αμφότερα τα οξέα, τείνουν να προσεγγίσουν το βέλτιστο συνδυασμό ανάπτυξης.



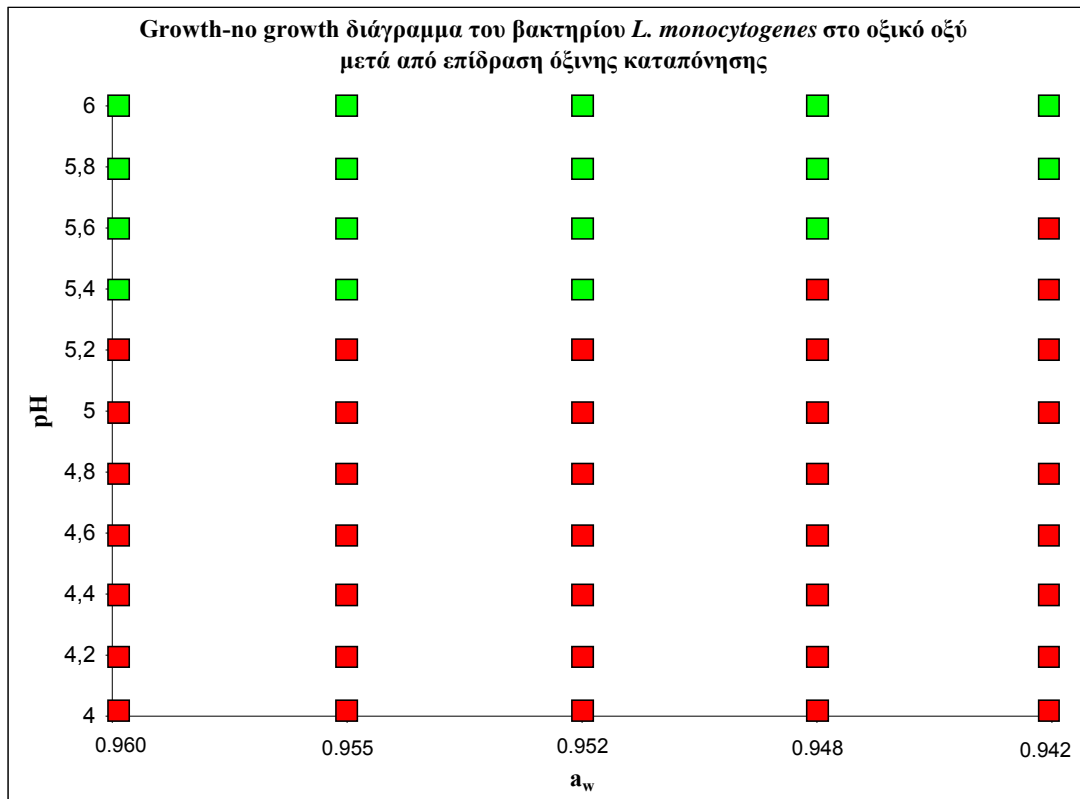
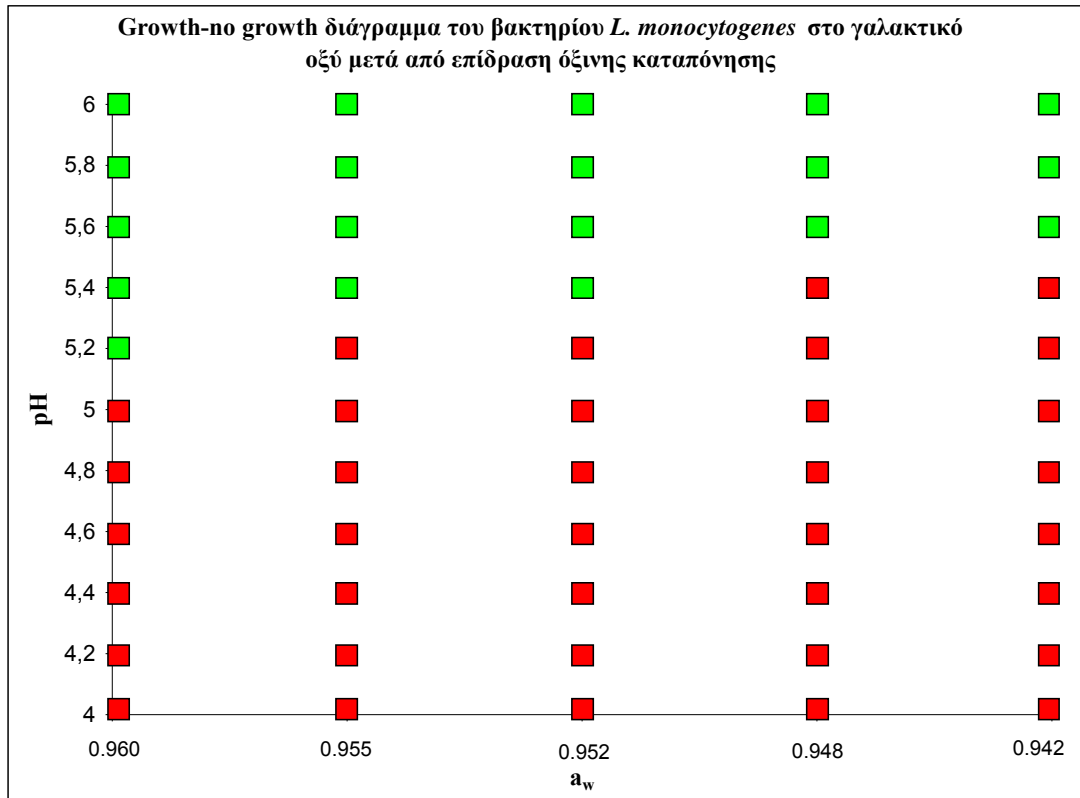
Σχήμα 15. Τρισδιάστατο συγκριτικό γράφημα τριών μεταβλητών (pH, a_w , λόγος επιφανειών). Απεικονίζεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* LQC 15015 σε υποστρώματα των οποίων το pH έχει ρυθμιστεί με χρήση γαλακτικού οξέος.



Σχήμα 16. Τρισδιάστατο συγκριτικό γράφημα τριών μεταβλητών (pH, a_w , λόγος επιφανειών). Απεικονίζεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* LQC 15015 σε υποστρώματα των οποίων το pH έχει ρυθμιστεί με χρήση οξικού οξέος.

3.2.2. Ανάπτυξη του στελέχους *Listeria monocytogenes* LQC 15015 κατόπιν προσαρμογής σε συνθήκες όξινης καταπόνησης – Σύγκριση με συνθήκες μη προσαρμογής

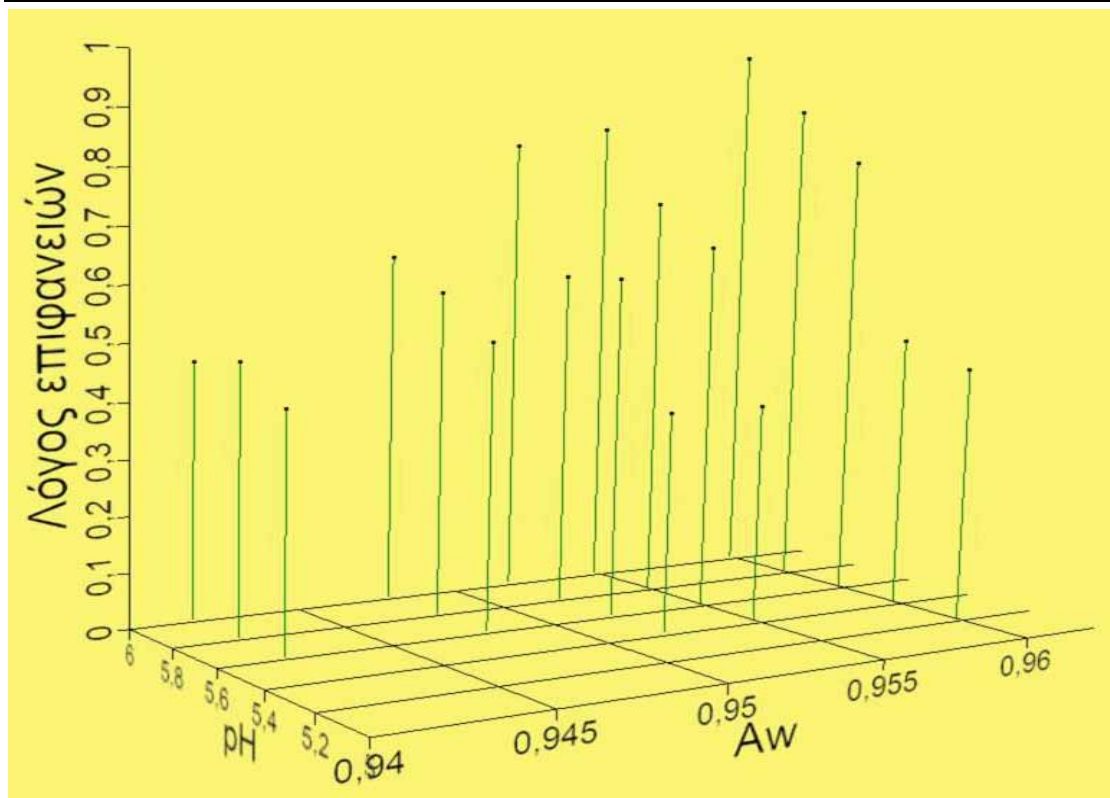
Στην προηγούμενη παράγραφο είδαμε την ανάπτυξη του στελέχους *Listeria monocytogenes* LQC 15015 σε υποστρώματα με διαβάθμιση του pH και της ενεργότητας νερού χωρίς να έχει προηγηθεί προσαρμογή του σε συνθήκες όξινης καταπόνησης. Σ' αυτή την παράγραφο θα δούμε τη συμπεριφορά του βακτηρίου κατά τον ενοφθαλμισμό του στα ίδια υποστρώματα ανάπτυξης (Πίνακας 14 παρ. 3.1.1.) κατόπιν όμως προσαρμογής του σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (TSBYE pH 5.0) και επαγωγής της οξεοανθεκτικότητάς του. Κατόπιν συγκρίσεως των σχημάτων 17, 18 και 19 που ακολουθούν με τα αντίστοιχα Σχήματα 14, 15 και 16 της παραγράφου 3.2.1. γίνεται φανερό ότι η έκθεση του βακτηρίου σε συνθήκες όξινης καταπόνησης, είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της οξεοανθεκτικότητάς του, που οδήγησε στην ανάπτυξη του στελέχους σ' ένα μεγαλύτερο εύρος τιμών pH και a_w συγκριτικά με τις συνθήκες μη προσαρμογής. Συγκεκριμένα παρατηρούμε ότι στα υποστρώματα των



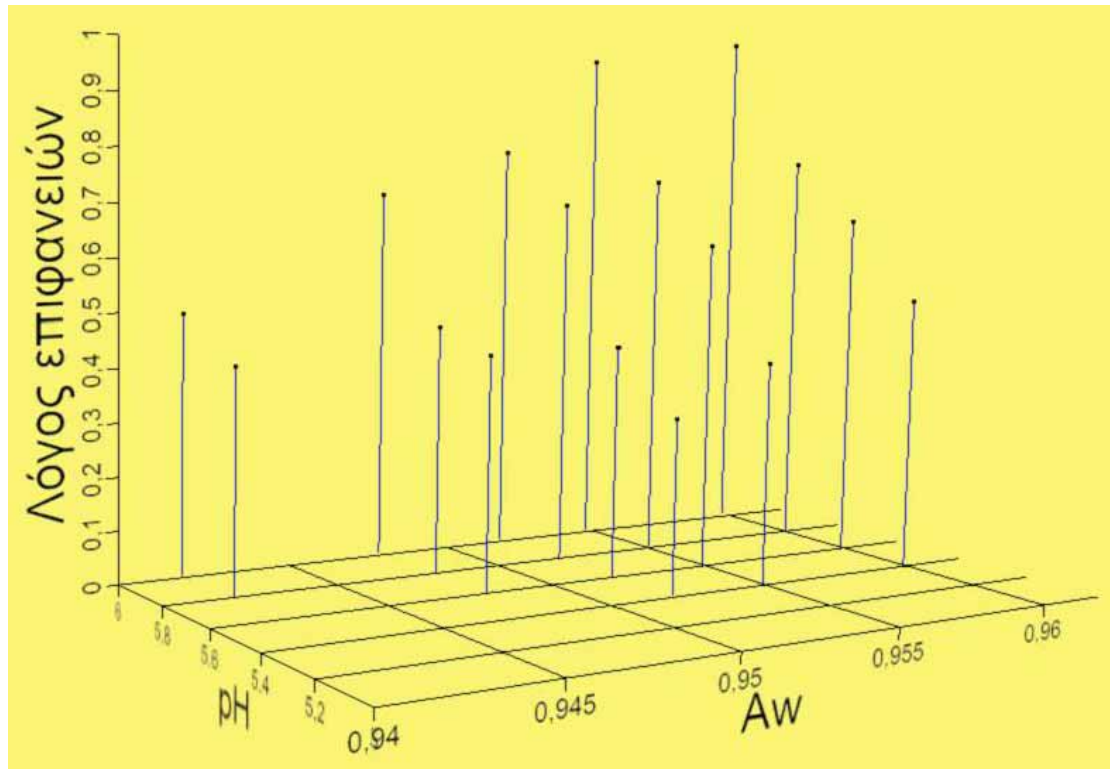
Σχήμα 17. Γραφική απεικόνιση ανάπτυξης-μη ανάπτυξης του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* LQC 15015 σε υποστρώματα με διαβάθμιση του pH και της a_w κατόπιν επίδρασης όξινης καταπόνησης.
 Κόκκινα σημεία = δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη στο συγκεκριμένο συνδυασμό pH - a_w
 Πράσινα σημεία = παρατηρήθηκε ανάπτυξη στο συγκεκριμένο συνδυασμό pH - a_w

οποίων το pH είχε ρυθμιστεί με χρήση γαλακτικού οξέος, ανάπτυξη του στελέχους *Listeria monocytogenes* LQC 15015 επετεύχθη σε τιμή pH 5.22 με ελάχιστη τιμή ενεργότητας νερού 0.960 (έναντι 5.62 και 0.948 στην περίπτωση της μη προσαρμογής) και φθάνει μέγιστη τιμή pH και ελάχιστη τιμή a_w , 6.03 και 0.942 όπως και στην περίπτωση της μη προσαρμογής. Παράλληλα με την αύξηση της οξεοανθεκτικότητας του βακτηρίου, παρατηρούμε και αύξηση της ανεκτικότητάς του σε υψηλότερες συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου αφού σε τιμές pH 5.62 και 5.82 ανάπτυξη επετεύχθη σε ελάχιστη τιμή a_w 0.942 (έναντι 0.948 στη μη προσαρμογή). Η οξεοανθεκτικότητα του βακτηρίου στο οξικό οξύ κατόπιν προσαρμογής σε συνθήκες όξινης καταπόνησως δε φαίνεται να έχει αυξηθεί. Παρολ' αυτά όμως ενισχύθηκε η ανεκτικότητά του σε χαμηλότερες τιμές a_w αφού σε τιμές pH 5.41 και 5.80 οι ελάχιστες τιμές ενεργότητας νερού στις οποίες παρατηρείται ανάπτυξη είναι 0.952 και 0.942 αντίστοιχα (έναντι 0.960 και 0.948 στη μη προσαρμογή).

Ίδια εικόνα λαμβάνουμε και από τα τρισδιάστατα γραφήματα των σχημάτων 18 και 19 όπου οι συνδυασμοί pH- a_w συναρτώνται με το λόγο των επιφανειών. Παρατηρούμε και πάλι ότι κινούμενοι από μικρότερες σε μεγαλύτερες τιμές pH και a_w αυξάνεται ο λόγος των επιφανειών, κάτι το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι όσο μεγαλύτερη τιμή pH και a_w επικρατεί τόσο πιο ευνοϊκές είναι οι συνθήκες για την ανάπτυξη του βακτηρίου. Σύμφωνα με τα προαναφερθέντα η προσαρμογή του στελέχους σε συνθήκες όξινης καταπόνησης αύξησε το εύρος ανάπτυξης του μικροοργανισμού και στα δύο οργανικά οξέα κάτι το οποίο φαίνεται και στα γραφήματα των σχημάτων 18 και 19. Έτσι στο μεν γαλακτικό οξύ, η μέγιστη τιμή του λόγου των επιφανειών, ίση με 1, παρατηρείται στο ζεύγος τιμών pH- a_w : 6.03-0.960 και οι μικρότερες 0.39 και 0.42 στα ζεύγη τιμών 5.43-0.952 και 5.62-0.942 αντίστοιχα. Στο οξικό οξύ, η μέγιστη τιμή του λόγου των επιφανειών (ίση με 1) παρατηρείται επίσης στο ζεύγος τιμών pH- a_w : 6.03-0.960 και οι μικρότερες 0.33 και 0.42 στα ζεύγη τιμών 5.41-0.952 και 5.80-0.942 αντίστοιχα. Είναι φανερό ότι οι μικρότερες τιμές του λόγου των επιφανειών εντοπίζονται σε εκείνους τους συνδυασμούς pH- a_w πέραν των οποίων δεν παρατηρείται ανάπτυξη του στελέχους *Listeria monocytogenes* LQC 15015.



Σχήμα 18. Τρισδιάστατο συγκριτικό γράφημα τριών μεταβλητών (pH, a_w , λόγος επιφανειών). Απεικονίζεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* LQC 15015 - μετά την επίδραση όξινης καταπόνησης - σε υποστρώματα των οποίων το pH έχει ρυθμιστεί με χρήση γαλακτικού οξέος.



Σχήμα 19. Τρισδιάστατο συγκριτικό γράφημα τριών μεταβλητών (pH, a_w , λόγος επιφανειών). Απεικονίζεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* LQC 15015 - μετά την επίδραση όξινης καταπόνησης - σε υποστρώματα των οποίων το pH έχει ρυθμιστεί με χρήση οξικού οξέος.

3.2.3. Συζήτηση

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 και Yousef, 1997). Η απόκτηση αυξημένης όξινης ανθεκτικότητας περιλαμβάνει την έκθεση σε ήπια όξινες συνθήκες ανάπτυξης (Koutsoumanis et al., 2003) και έχει τεκμηριωθεί πολλάκις σε μια μεγάλη ομάδα τροφιμογενών παθογόνων βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των μικροοργανισμών *Salmonella* spp. (Foster, 1993· Foster και Hall, 1990· Lee et al., 1995), *S. flexneri* (Small et al., 1994), *V. cholerae* (Merrell and Camilli, 1999) και *Listeria* (Cataldo et al., 2007· Davis et al., 1996· O'Driscoll et al., 1996). 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 και Condon, 2002· Flahaut et al., 1996). Οι προσαρμοσμένες σε συνθήκες όξινης καταπόνησης καλλιέργειες έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν ανθεκτικότητα έναντι στη θέρμανση και την ακτινοβόληση (Samelis et al., 2003). Το φαινόμενο αυτό που ονομάζεται και «σκληραγώγηση υπό συνθήκες καταπόνησης» (stress hardening) παρατηρείται και στο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* (Faleiro et al., 2003· O'Driscoll et al., 1996· Lou και Yousef, 1997· Skandamis et al., 2008). Οι καλλιέργειες *L. monocytogenes* που υπέστησαν προσαρμογή με ταυτόχρονη έκθεση σε μια πληθώρα εμποδίων (pH 5.0, NaCl 10%, θέρμανση στους 46°C) επέδειξαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα κατά τη μετέπειτα καλλιέργειά τους σε TSBYE pH 3.5 (ρυθμισμένο με γαλακτικό οξύ) απ'ότι οι καλλιέργειες που είχαν υποστεί διαδοχική προσαρμογή σε κάθε εμπόδιο (Skandamis et al., 2008). Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Tiganitis et al. (2009) οι οποίοι κατά την έκθεση του βακτηρίου *L. monocytogenes* σε χαμηλές τιμές pH (4.0 και 4.5) και υψηλές συγκεντρώσεις άλατος (15 και 20% NaCl σε pH 7.2) διαδοχικά ή ταυτόχρονα σε θερμοκρασίες 5° και 10°C, παρατήρησαν ότι διαδοχική έκθεση του βακτηρίου σε χαμηλό pH και έπειτα σε υψηλή συγκέντρωση άλατος προκαλούσε μεγαλύτερη μείωση του πληθυσμού από την αντίστροφη πορεία, ενώ αντίθετα τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα την επέδειξε το βακτήριο *L. monocytogenes* κατά την ταυτόχρονη εφαρμογή χαμηλού pH και a_w (υψηλή συγκέντρωση NaCl).

Θα μπορούσε εδώ να αναφερθεί ότι οι φυσιολογικές αλλαγές που επάγονται από την όξινη καταπόνηση, όπως είναι η πιθανή σύνθεση πρωτεϊνών όξινης κατάπληξης (acid shock proteins - ASPs) (O'Driscoll et al., 1997· Phan-Thanh et al., 2000), είναι πιθανότατα πιο απαραίτητες για την επίτευξη ανθεκτικότητας σε όξινο περιβάλλον από αυτές που επάγονται σε συνθήκες θερμικής ή ωσμωτικής καταπόνησης (Leyer και Johnson, 1993). Από τους ίδιους ερευνητές αναφέρθηκε ότι παρά το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες όξινης κατάπληξης επιφέρουν ανθεκτικότητα σε θερμική καταπόνηση, η σύνθεση πρωτεϊνών θερμικής κατάπληξης και ωσμωτικής κατάπληξης δεν ενισχύουν απαραίτητα την ανθεκτικότητα στην όξινη καταπόνηση (Leyer και Johnson, 1993). Αυτό φαίνεται να επιβεβαιώνεται στην περίπτωση της παρούσας εργασίας αφού όπως φάνηκε στην παράγραφο 3.2.2. η προσαρμογή σε συνθήκες ήπια όξινης καταπόνησης (pH 5.0) – και ειδικά στην περίπτωση που ως μέσο ρύθμισης του pH του υποστρώματος χρησιμοποιήθηκε το γαλακτικό οξύ – όχι μόνο προκάλεσε επαγωγή της οξεοανθεκτικότητας του στελέχους *Listeria monocytogenes* LQC 15015 αλλά ενίσχυσε και την ανθεκτικότητα σε πιο χαμηλές τιμές ενεργότητας νερού (συνθήκες ωσμωτικής καταπόνησης). Η λιστερίωση, για την οποία έγινε εκτεταμένη αναφορά στην παράγραφο 1.3.4., μεταδίδεται κυρίως μέσω κατανάλωσης «έτοιμων προς κατανάλωση» τροφίμων (Ready to eat – RTE foods) (Hof, 2003· McLauchlin et al., 2004· Kathariou, 2002· Tompkin, 2002). Στα τρόφιμα, η λιστέρια αντιμετωπίζει συχνά μη ευνοϊκές συνθήκες περιβάλλοντος και ως εκ τούτου η επιβίωσή της στηρίζεται στη δυνατότητα να αντιλαμβάνεται, να «δισθάνεται» και να ανταποκρίνεται τις διακυμάνσεις του. Η δυσκολία στον έλεγχο της ανάπτυξης του βακτηρίου αυτού στα τρόφιμα έγκειται και στο γεγονός ότι το βακτήριο *L. monocytogenes* είναι ένας σχετικά ανθεκτικός μικροοργανισμός. Η ανάλυση των θερμοκρασιών για τον πολλαπλασιασμό του δείχνει ότι η ανάπτυξη πραγματοποιείται μεταξύ -1.7°C και 45.1°C (Membre et al., 2005). Το βακτήριο μπορεί επίσης να πολλαπλασιαστεί και σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις άλατος (NaCl μέχρι 10%· Sleator et al., 2003), κάτι το οποίο έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με τα δεδομένα της παρούσας μελέτης όπου το όξινα προσαρμοσμένο στέλεχος *L. monocytogenes*, κατάφερε σε τιμές pH 5.6 έως 6.0 να αναπτυχθεί ακόμα και σε ενεργότητα νερού 0.942 (NaCl 8%). Επίσης το βακτήριο έχει παρατηρηθεί να αναπτύσσεται σε χαμηλές τιμές pH περίπου 4.3 σε θρεπτικά μέσα που έχουν υποστεί ρύθμιση του pH με HCl (George et al., 1988· Tienungoon et al., 2000· Koutsoumanis et al., 2004), αν και ακόμα χαμηλότερες τιμές έχουν επίσης καταγραφεί ανάλογα και με την αρχική

συγκέντρωση του ενοφθαλμίσματος (Koutsoumanis και Sofos, 2005). Λόγω του ότι στα τρόφιμα η μολυσματική δόση από ένα παθογόνο μικροοργανισμό είναι συνήθως μικρή, σημασία έχει να μελετηθεί η επίδραση των διαφόρων συνθηκών σε μικρές συγκεντρώσεις ενοφθαλμίσματος του παθογόνου (χωρίς να παραβλέπονται οι μεγάλες ποσότητες), οπότε βάσει των Koutsoumanis και Sofos (2005) η ανάπτυξη καθίσταται δυνατή σε τιμές pH πάνω από 4.8 και 5.0 σε αντίστοιχες ενεργότητες νερού 0.960 και 0.940 στους 15°C (με τα αποτελέσματα να είναι παρόμοια πλησίον των 30°C). Με τα δεδομένα αυτά συμφωνεί η παρούσα εργασία παρά το γεγονός ότι τα κατώτερα όρια ανάπτυξης που παρατηρήθηκαν – όσον αφορά στο pH – είναι υψηλότερα (βλ. παρ. 3.2.2.).

Έχει φανεί από μελέτες ότι τα κύτταρα *L. monocytogenes*, που έχουν υποβληθεί σε προσαρμογή υπό συνθήκες όξινης καταπόνησης, ενισχύθηκαν σημαντικά από απόψεως επιβίωσης κατά τη διάρκεια αποθήκευσης τροφίμων χαμηλού pH όπως είναι το τυρί cottage, το γιαούρτι, το τυρί Cheddar και διάφορες σάλτσες (pH 5.16–5.25· Gahan et al., 1996) αλλά και άλλου είδους μαλακά τυριά (pH 5.5 με γαλακτικό οξύ με ταυτόχρονη παρουσία άλμης (NaCl 5.8%)) (Bolton και Frank, 1999) και προϊόντα κρέατος (π.χ. αλλαντικά τύπου φρανκφούρτης) που υποβάλλονται σε επιφανειακή επεξεργασία (pH 4.7–4.8 ή 5.47–5.92) με οργανικά οξέα όπως γαλακτικό και οξικό οξύ (Geornaras et al., 2005· Stopforth et al., 2005). Μάλιστα στην περίπτωση αλλαντικών τύπου Φρανκφούρτης στα οποία χρησιμοποιήθηκε δισοζικό νάτριο 0.25% και εμβαπτίστηκαν σε γαλακτικό οξύ 2.5% (pH επιφανείας 5.5) φάνηκαν να ανθίστανται σε περιβάλλον εξομοίωσης γαστρικού υγρού (pH 1.0) κατά τη διάρκεια αποθήκευσης 40 ημερών στους 10°C (Stopforth et al., 2005). Οι Lindqvist και Lindblad (2009) στα πειράματα που πραγματοποίησαν με ανάπτυξη του προσαρμοσμένου (με χρήση TSB+1% γλυκόζη) σε συνθήκες όξινης καταπόνησης βακτηρίου *L. monocytogenes*, αφενός σε BHI broth (pH 4.4 ρυθμισμένο με γαλακτικό οξύ και a_w 0.93-0.94) και αφετέρου σε ζυμούμενα αλλαντικά, σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες 8° και 22°C, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο πληθυσμός του μικροοργανισμού παρουσίαζε ταχύτερη μείωση σε θερμοκρασία 22°C συγκριτικά με τους 8°C, καταδεικνύοντας έτσι το ρόλο που μπορεί να παίξει η θερμοκρασία στην αδρανοποίηση του μικροοργανισμού. Πρόσφατη μελέτη στα μαλακά τυριά ιταλικού τύπου κατέληξε στο συμπέρασμα ότι ακόμα και τα κύτταρα που δεν έχουν υποστεί προσαρμογή αποκτούν ανθεκτικότητα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης ορισμένων τυριών (Cataldo et al., 2007). Αντίθετα, όσον αφορά έναν άλλο αριθμό τροφίμων η

προσαρμογή σε συνθήκες όξινης καταπόνησης δεν επηρέασε τη μετέπειτα επιβίωση των βακτηρίων (Foley et al., 2005· Formato et al., 2007).

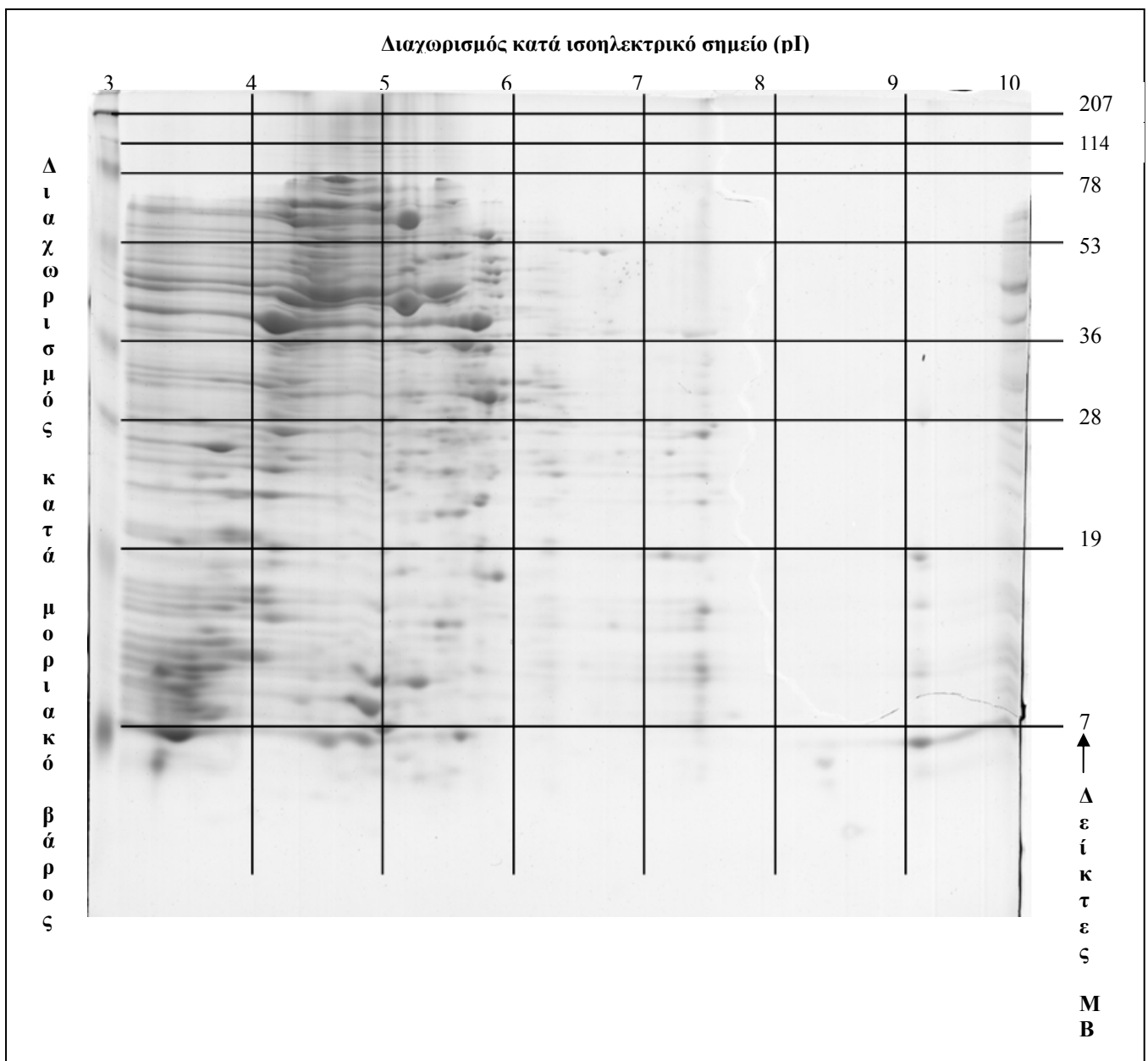
Οι ελάχιστες τιμές pH και a_w που παρατηρήθηκαν κατά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε TSB broth ήταν 4.45 και 0.900 αντίστοιχα σε θερμοκρασίες 15-30°C, ενώ σε χαμηλότερες θερμοκρασίες οι ελάχιστες τιμές pH και a_w που επέτρεπαν την ανάπτυξη ήταν μεγαλύτερες (Koutsoumanis et al., 2004). Επιπλέον σε τιμές ενεργότητας νερού 0.955 και 0.942 οι αντίστοιχες ελάχιστες τιμές pH στις οποίες παρατηρήθηκε ανάπτυξη ήταν 5.47 και 5.96 στους 4°C και 4.96 (και για τις δύο τιμές a_w) στους 30°C. Τα αποτελέσματα αυτά διαφέρουν από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης – όπου το στέλεχος *Listeria monocytogenes* LQC 15015 αναπτύχθηκε σε BHI broth στους 37°C χωρίς προτέρα προσαρμογή σε συνθήκες όξινης καταπόνησης – όπου για ενεργότητες νερού 0.955 και 0.942 οι ελάχιστες τιμές pH ήταν 5.62 και 6.03 αντίστοιχα είτε είχε γίνει χρήση γαλακτικού οξέος ως μέσου ρύθμισης του pH, είτε είχε χρησιμοποιηθεί οξικό οξύ. Ο λόγος για τον οποίο παρατηρείται αυτή η διαφορά είναι πιθανότατα η φύση του οξέος που χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση του pH του μέσου ανάπτυξης. Το HCl (υδροχλωρίο) που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη των Koutsoumanis et al. (2004) είναι ένα ισχυρό ανόργανο οξύ και κατ'επέκταση αναποτελεσματικό στο να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη και να αναστείλει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, με αποτέλεσμα αυτός να έχει τη δυνατότητα ανάπτυξης σε αρκετά χαμηλές τιμές pH. Το γαλακτικό και το οξικό οξύ αντίθετα είναι δύο ασθενή οργανικά οξέα οπότε επιτυγχάνουν πολύ πιο εύκολα τη διείσδυση εντός του μικροβιακού κυττάρου – με την αδιάστατη μορφή τους – και καταφέρνουν να το αδρανοποιήσουν (Phan-Thanh et al., 2000· Jordan et al., 1999), με αποτέλεσμα οι ελάχιστες τιμές pH στις οποίες η ανάπτυξη καθίσταται δυνατή να είναι σαφώς μεγαλύτερες από εκείνες του υδροχλωρίου. Κατά τη μελέτη της συμπεριφοράς εννέα στελεχών *L. monocytogenes* (Faleiro et al., 2003), τέσσερα από τα στελέχη ήταν ικανά να αναπτυχθούν σε τιμές pH 5.5 (ρύθμιση με γαλακτικό οξύ) και άνω στους 30° και 8°C χωρίς όμως να έχουν υποστεί όξινη προσαρμογή, ενώ κανένα από τα στελέχη δεν κατάφερε να αναπτυχθεί σε συγκέντρωση 8% NaCl που είναι κάτω από τη συγκέντρωση (10% w/v) που έχει αναφερθεί ως ανώτερη ανεκτή σε σύνθετα μέσα ανάπτυξης με pH 5.0 έως 8.0 (ρυθμισμένο με HCl) στους 25°C (McClure et al., 1989). Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν εν μέρει με την παρούσα μελέτη αφού η κατώτερη τιμή του pH που επέτρεπε ανάπτυξη ήταν και στην περίπτωση μας 5.62 στο γαλακτικό και 5.41 στο οξικό οξύ, αλλά το στέλεχος *Listeria*

monocytogenes LQC 15015 αναπτύχθηκε και σε ενεργότητα νερού 0.942 (8% NaCl) σε αντίθεση με τα στελέχη των Faleiro et al. (2003). Σύμφωνα με τους Farber et al. (1989) οι τιμές pH 5.0 και 5.5, όταν έχουν ρυθμιστεί με γαλακτικό οξύ, είναι οι ελάχιστες που θα επιτρέψουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*. Στο πείραμα των Faleiro et al. (2003) η ελάχιστη τιμή του pH ανάπτυξης (5.5) των μη προσαρμοσμένων στελεχών, χρησιμοποιήθηκε ως η τιμή pH που θα επάγει την ανθεκτικότητα σε πιο ακραία όξινης συνθήκες (pH 3.5, >1h στους 30°C). Τα περισσότερα από τα στελέχη *L. monocytogenes* χρειάστηκαν κατ'ελάχιστο 2h (ορισμένα ακόμα και 4h) για επίτευξη μέγιστης οξεοανθεκτικότητας. Πιθανότατα αν είχε εκτεθεί και το στέλεχος της παρούσας μελέτης για περισσότερο χρόνο στις ίδιες συνθήκες ήπια όξινης καταπόνησης (TSBYE pH 5.0 στους 37°C) να είχε αποκτήσει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε χαμηλότερες τιμές pH.

3.2.4. Επίδραση στο πρωτέωμα

Η επίδραση της προσαρμογής σε συνθήκες όξινης καταπόνησης επί του πρωτεώματος του στελέχους *Listeria monocytogenes* LQC 15015, αξιολογήθηκε όπως και στην περίπτωση του στελέχους *E. coli* ATCC 25922 (παρ. 3.1.4.), με χρήση ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμιδίου δύο διαστάσεων (2D GE) (παράγραφος 2.4.9.3.) σε συνδυασμό με το λογισμικό ηλεκτρονικού υπολογιστή PDQuest Advanced 8.0.1 (BIO-RAD) και τη βοήθεια σαρωτή-μετρητή οπτικής πυκνότητας πηκτών πολυακρυλαμιδίου (GS 800 Calibrated Densitometer, BIO-RAD).

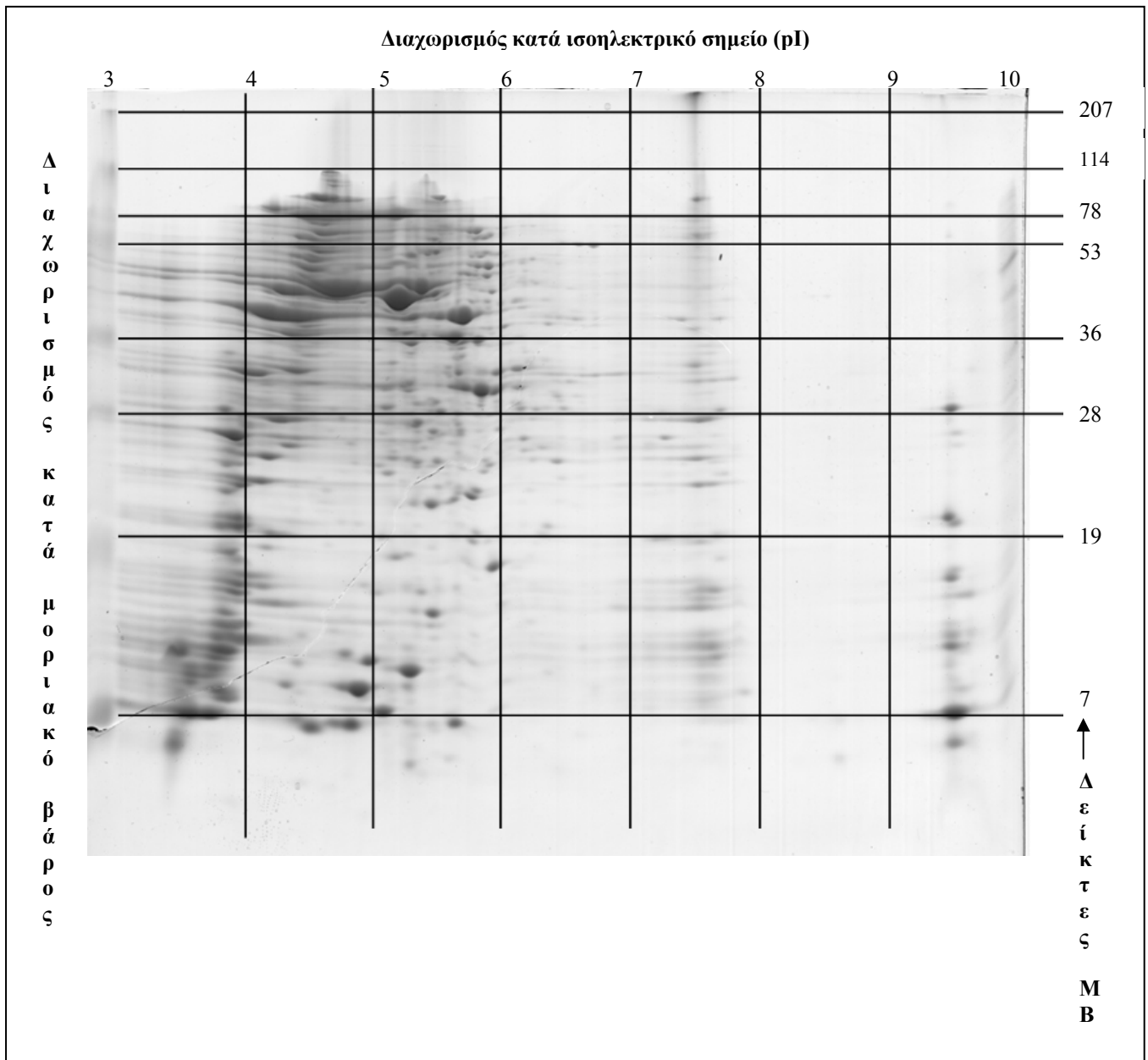
3.2.4.1. Πρωτεϊνική κατατομή σε συνθήκες μη προσαρμογής



Σχήμα 20. Επίδραση συνθηκών μη προσαρμογής (pH 7.0) στο πρωτέωμα του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* LQC 15015 μετά από ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου δύο διαστάσεων.

Στο Σχήμα 20 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της 2D SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης των εν μέσω λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης, κυττάρων του στελέχους *Listeria monocytogenes* LQC 15015, χωρίς προηγουμένως να έχουν υποστεί προσαρμογή σε συνθήκες ήπια όξινης καταπόνησης.

3.2.4.2. Πρωτεϊνική κατατομή σε συνθήκες όξινης προσαρμογής

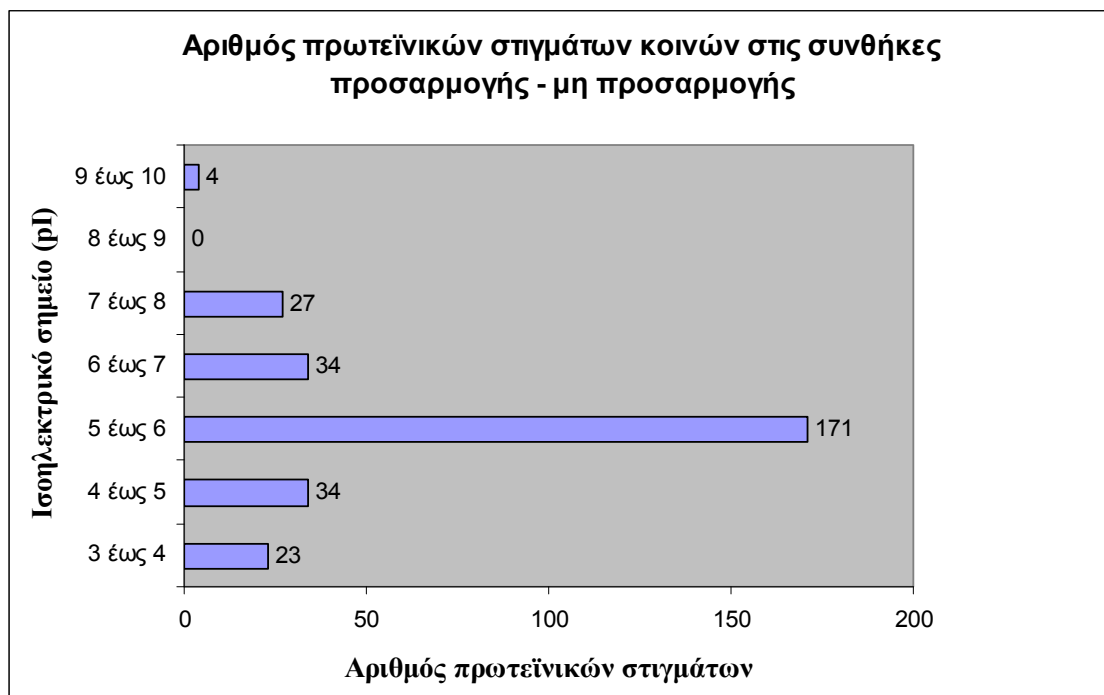


Σχήμα 21. Επίδραση συνθηκών όξινης προσαρμογής (pH 5.0) στο πρωτέωμα του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* LQC 15015 μετά από ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδιου δύο διαστάσεων.

Μετά την προσαρμογή του στελέχους *Listeria monocytogenes* LQC 15015 σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (pH 5.0), η πρωτεϊνική κατατομή (πρωτέωμα) του βακτηρίου παρουσιάζει την εικόνα του Σχήματος 21.

3.2.4.3. Σύγκριση μεταξύ συνθηκών προσαρμογής και μη προσαρμογής και ταυτοποίηση πρωτεϊνών

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων που λαμβάνουμε από τις ηλεκτροφορήσεις πραγματοποιείται όπως προαναφέρθηκε, με σάρωση και ταυτόχρονη επεξεργασία των αποτυπωμένων επί των πηκτών της ηλεκτροφόρησης πρωτεωμάτων, με το λογισμικό ηλεκτρονικού υπολογιστή PDQuest Advanced 8.0.1 της BIO-RAD. Ο εντοπισμός ομοιοτήτων ή διαφορών έγκειται στην εύρεση πρωτεϊνικών στιγμάτων κοινά απαντώμενων τόσο σε συνθήκες προσαρμογής όσο και μη προσαρμογής, αλλά και στην εύρεση μοναδικών πρωτεϊνικών στιγμάτων που εμφανίζονται μόνο σε μια εκ των δύο περιπτώσεων. Ο αριθμός των κοινών πρωτεϊνικών στιγμάτων που εμφανίστηκαν στις περιπτώσεις προσαρμογής και μη προσαρμογής παρουσιάζονται στο ραβδόγραμμα του Σχήματος 22.



Σχήμα 22. Αριθμός κοινών πρωτεϊνικών στιγμάτων (των συνθηκών προσαρμογής – μη προσαρμογής) που αντιστοιχούν σε ένα εύρος τιμών ισοηλεκτρικού σημείου (pI) και προέκυψαν μετά από επεξεργασία με το λογισμικό PDQuest Advanced 8.0.1 της BIO-RAD.

Αναλυτική παρουσίαση θα ακολουθήσει μόνο για εκείνα τα στίγματα και τις αντιστοιχούσες σ'αυτά πρωτεΐνες, που εμφανίστηκαν στην περίπτωση προσαρμογής σε συνθήκες ήπια όξινης καταπόνησης, αφού πέραν των κοινών πρωτεϊνικών στιγμάτων μεταξύ των συνθηκών προσαρμογής – μη προσαρμογής δεν ανιχνεύθηκαν επαγόμενες πρωτεΐνες στην περίπτωση μη προσαρμογής (pH 7.0) (Πίνακας 18). Αυτή η μονομερής έκφραση πρωτεϊνών πιθανότατα να είναι και η εξήγηση της

παρατηρηθείσας αύξησης της οξειοανθεκτικότητας και ωσμοανθεκτικότητας του βακτηρίου κατόπιν προσαρμογής του (βλ. Σχήματα 14 και 17).

Κάθε ένα από τα εμφανισθέντα πρωτεϊνικά στίγματα επί της πηκτής της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων, αντιστοιχεί όπως αναφέρθηκε σε μια ή περισσότερες πρωτεΐνες, με γνωστά στοιχεία το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) και το μοριακό βάρος (σε kDa) – οριζόντιος και κάθετος άξονας αντίστοιχα των σχημάτων 20 και 21 – του κάθε στίγματος. Ο ποιοτικός προσδιορισμός των στιγμάτων που προέκυψαν, πραγματοποιήθηκε για μια ακόμη φορά με αναζήτηση των αντιστοιχουσών πρωτεϊνών στην ηλεκτρονική βάση δεδομένων EXPASY (<http://ca.expasy.org/tools/tagident.html>). Τα αποτελέσματα της αναζήτησης φαίνονται στον Πίνακα 18.

Πίνακας 18. Αποτελέσματα αναζήτησης στη βάση δεδομένων EXPASY για τον ποιοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών προερχόμενων από πρωτεϊνικά στίγματα, μετά από προσαρμογή του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* LQC 15015 σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (pH 5.0).

Κωδικός στίγματος	Στοιχεία στίγματος		Πιθανές πρωτεΐνες	Γονίδιο
	Μοριακό βάρος (kDa)	Ισοηλεκτρικό σημείο (pI)		
1118	10.44	3.65	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	ORF
1416	26.65	3.78	Πρωτεΐνη Lmo1461	-
2301	20.75	3.80	Πιθανή υπομονάδα δέλτα της DNA κατευθυνόμενης RNA πολυμεράσης (μεταγραφή του DNA)	groE
2202	17.17	3.81	Πρωτεΐνη Lmo1108	-
2205	16.84	3.86	Πρωτεΐνη Lmo1108	-
2309	21.14	3.90	Πρωτεΐνη Lmo1461	-
3301	24.43	4.34	Πρωτεΐνη ActA	actA
3108	10.15	4.65	Θεωρούμενη θειορεδοξίνη (thioredoxin) με αντιοξειδωτική δράση (αναγωγή άλλων πρωτεϊνών) Πρωτεΐνη Lmo0071	ORF -
4215	15.41	5.21	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη Πρωτεΐνη Lmo1691 (υδρολάση)	ORF -
4106	11.36	5.22	Πυροφωσφατάση του φωσφοριβοζυλο-ATP (βιοσύνθεση αμινοξέων, L-ιστιδίνης) Συστατικό ΠΑ PTS συστήματος	hisE ORF

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

			(φωσφοτρανσφεράση σακχάρων)	
5202	17.43	5.41	Φωσφοπαντεθενική αδενυλοτρανσφεράση (βιοσύνθεση συνενζύμου A) Απαμινάση κυτιδίνης/δεοξικυτιδυλικού οξέος (δέσμευση ψευδαργύρου) Μεθυλοτρανσφεράση της κυστεΐνης και πρωτεΐνη μεθυλίωσης DNA (επισκευή DNA)	coaD ORF ogt-2
5702	70.33	5.41	Πρωτεΐνη Lmo0644 Μεταφορέας ABC, περμεάση δέσμευσης ATP (διαμεμβρανική μεταφορά συστατικών)	- ORF
5207	15.40	5.60	Πρωτεΐνη Lmo0387 Πρωτεΐνη μαστιγίων κύριου σώματος FlgB	- flgB
6526	31.52	6.70	Πρωτεΐνη Ser/Thr (φωσφατάση) Πρωτεΐνη Lmo2106	ORF -
7101	10.28	7.57	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	ORF
7209	18.07	7.67	Μεταγραφικός ρυθμιστής MerR (εξαρτώμενος από το DNA)	ORF
8402	26.73	9.52	Μεταφορέας ABC, πρωτεΐνη δέσμευσης ATP Θεωρούμενη πρωτεΐνη μεμβράνης	- -
8303	23.90	9.56	Πρωτεΐνη Lmo1212	-
8403	24.81	9.56	Θεωρούμενη διαμεμβρανική πρωτεΐνη αίσθησης τύπου agrB Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	- ORF

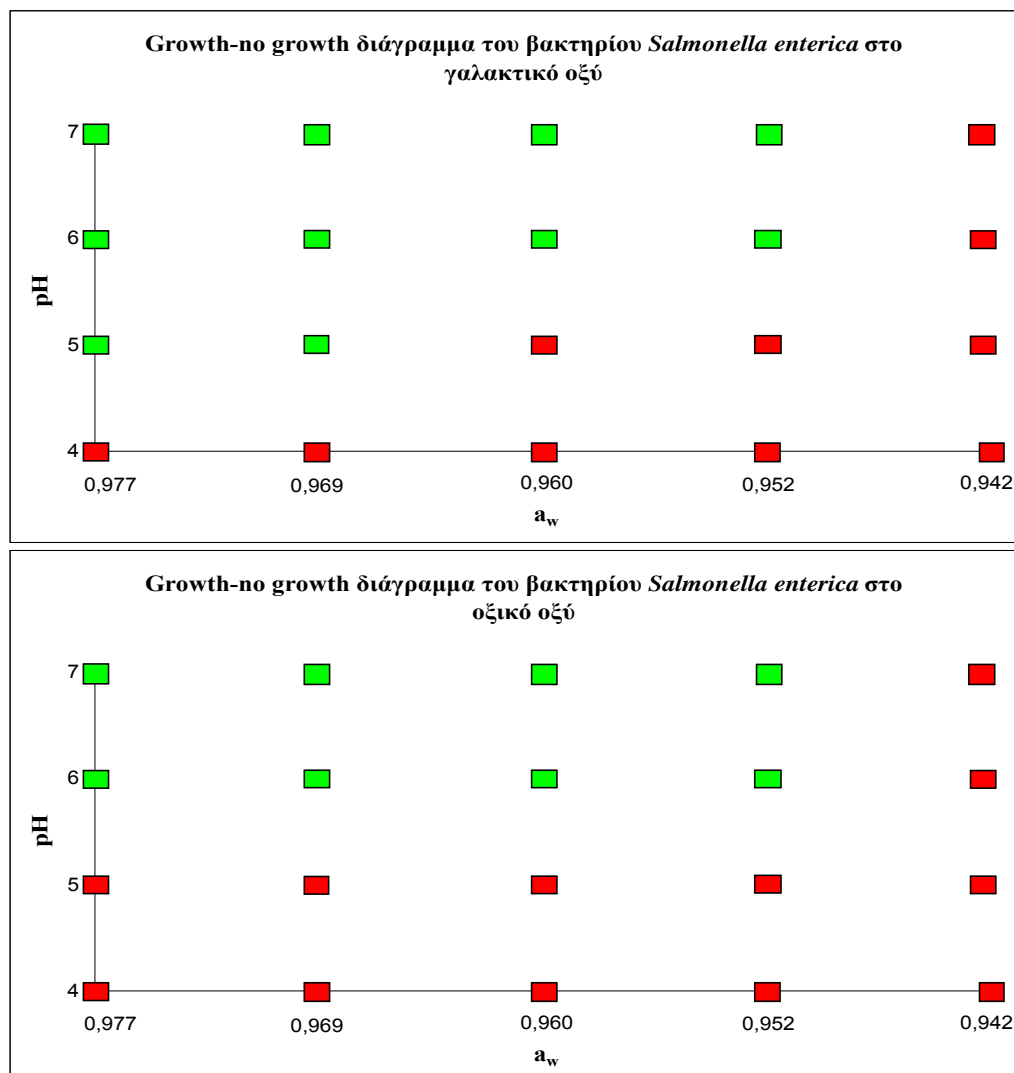
Από τη μελέτη του Πίνακα 18 φαίνεται ότι η επίδραση των συνθηκών προσαρμογής επί του στελέχους *Listeria monocytogenes* LQC 15015 είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή ενός πλήθους πρωτεϊνών (και ενζύμων) κάτι το οποίο πιθανότατα υποδηλώνει εμπλοκή τους σε διάφορες περαιτέρω μεταβολικές διεργασίες σχετιζόμενες με έκφραση γονιδίων και επαγωγή πρωτεϊνών. Εξ αυτών ξεχωρίζουν η πρωτεΐνη επιφανείας ActA, η οποία συμβάλλει στην εξάπλωση του βακτηρίου από το ένα κύτταρο στο άλλο και η σύνθεσή της επάγεται μαζί με άλλες πρωτεΐνες και τη λιστεριολυσίνη O (LLO) σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (>42°C), όξινης ή οσμωτικής καταπόνησης και έλλειψης θρεπτικών συστατικών (Sokolovic et al., 1993, 1990). Η φωσφοτρανσφεράση σακχάρων που κωδικοποιήθηκε εξειδικεύεται στη μεταφορά σακχάρων τα οποία έχουν μεγάλο αντίκτυπο στην πρόκληση

λοιμοτοξικότητας από το μικροοργανισμό *L. monocytogenes*. Η μεθυλοτρανσφεράση της κυστεΐνης είναι ένα ακόμα ένζυμο το οποίο έχει σαν σκοπό την κατάλυση της αντίδρασης μεθυλίωσης του DNA και επιδιόρθωσης-αποκατάστασής του κατόπιν έκθεσης σε χημικούς ή φυσικούς παράγοντες. Η μεθυλίωση του DNA, που έχει παρατηρηθεί κυρίως στους μικροοργανισμούς *E. coli* και *Salmonella* spp. είναι ένας μηχανισμός με τον οποίο τα βακτήρια ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων και κρατούν υπό έλεγχο διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως η αντιγραφή του DNA, η διόρθωση λαθών και ο διαχωρισμός του χρωμοσωμικού DNA (Marinus, 1996).

3.3. Επίδραση των πειραματικών συνθηκών επί του στελέχους *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LQC 15100

3.3.1. Ανάπτυξη του στελέχους *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LQC 15100

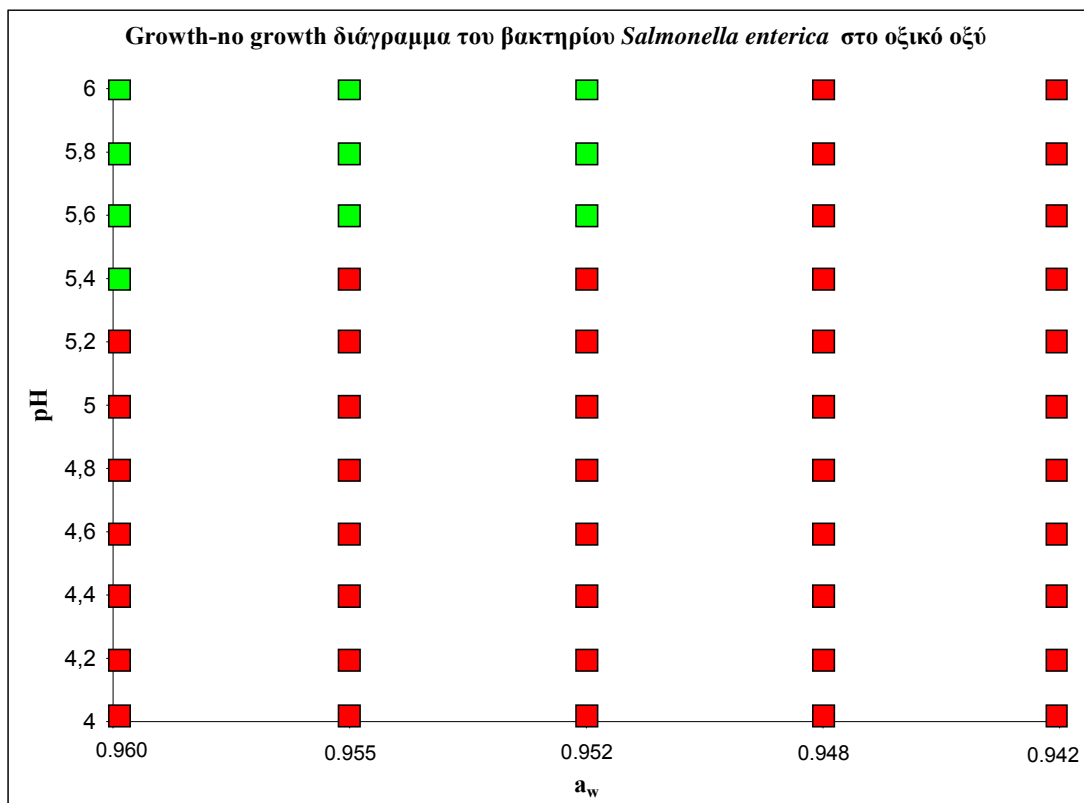
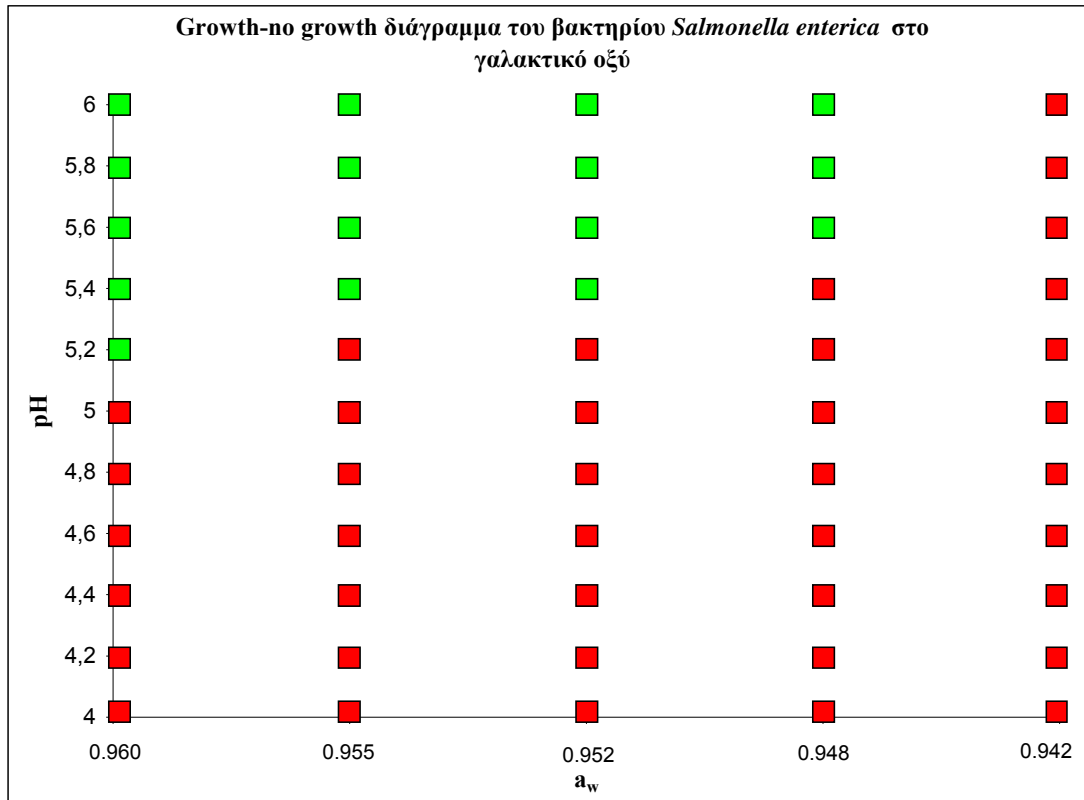
Στην παράγραφο 3.1.1. περιγράφηκαν οι συνθήκες ανάπτυξης του στελέχους *E. coli* ATCC 25922 και οι οποίες είναι κοινές για τους υπόλοιπους τρεις μικροοργανισμούς των οποίων η συμπεριφορά μελετηθήκε. Έτσι και στην περίπτωση του στελέχους *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 ή για συντομία *S. enterica*, οι συνδυασμοί pH και a_w των υποστρωμάτων στα οποία ενοφθαλμίστηκε το βακτήριο φαίνονται στον Πίνακα 14 της παραγράφου 3.1.1.



Σχήμα 23. Γραφική απεικόνιση ανάπτυξης-μη ανάπτυξης του βακτηρίου *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 σε υποστρώματα με διαβάθμιση του pH και της a_w (προκαταρκτικό πείραμα).
Κόκκινα σημεία = δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη στο συγκεκριμένο συνδυασμό pH - a_w
Πράσινα σημεία = παρατηρήθηκε ανάπτυξη στο συγκεκριμένο συνδυασμό pH - a_w

Από την ανάπτυξη ή μη του μικροοργανισμού στα υποστρώματα του Πίνακα 14 (προκαταρκτικό πείραμα) προκύπτουν τα αποτελέσματα του Σχήματος 23 (απεικόνιση ανάπτυξης–μη ανάπτυξης/growth–no growth interface). Από το σχήμα γίνεται φανερό ότι όσον αφορά στο προκαταρκτικό πείραμα ευρέων ορίων, όπως και στην περίπτωση του μικροοργανισμού *E. coli*, το βακτήριο *Salmonella enterica* κατάφερε να αναπτυχθεί καλύτερα στα υποστρώματα που είχαν υποστεί ρύθμιση του pH με γαλακτικό οξύ από εκείνα με οξικό οξύ. Πέραν της ανάπτυξης που παρατηρείται σε τιμές pH από 6 έως και 7 και ενεργότητες νερού από 0.977 έως και 0.952 και στα δύο οργανικά οξέα, στο γαλακτικό οξύ το στέλεχος αναπτύσσεται επιπλέον και σε pH 5.02 και ελάχιστη ενεργότητα νερού 0.969, ενώ σε κανένα συνδυασμό pH- a_w είτε στο γαλακτικό είτε στο οξικό οξύ δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη σε ενεργότητα νερού 0.942 (NaCl 8% w/v). Όπως και στην περίπτωση των στελεχών *E. coli* ATCC 25922 και *Listeria monocytogenes* LQC 15015 έτσι και με τη *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 το προκαταρκτικό πείραμα δεν είναι ικανό από μόνο του να δώσει πλήρη εικόνα του εύρους ανάπτυξης του μικροοργανισμού, οπότε θα μελετηθεί σε ένα στενότερο εύρος τιμών pH και a_w (Πίνακας 14 παρ. 3.1.1). Η απεικόνιση της ανάπτυξης–μη ανάπτυξης (growth–no growth interface) του βακτηρίου *Salmonella enterica* στο νέο εύρος τιμών pH και ενεργότητας νερού παρουσιάζεται στο Σχήμα 24.

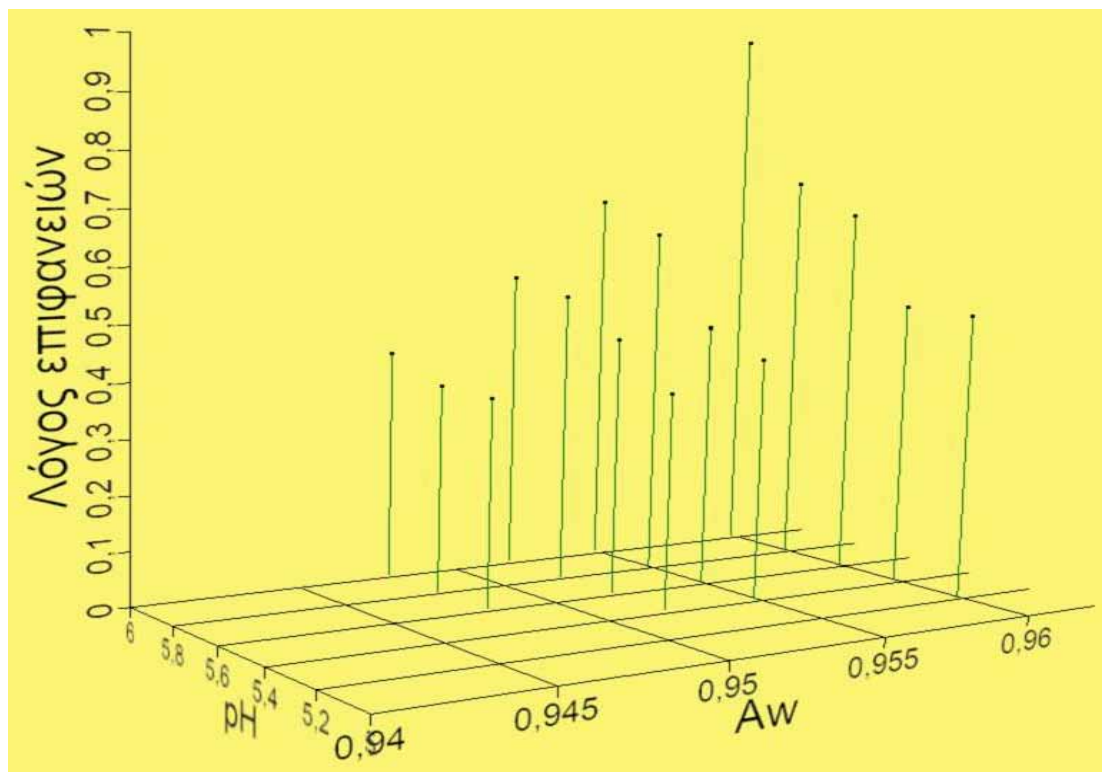
Στο προκαταρκτικό πείραμα, παρατηρήθηκε η μειωμένη ανθεκτικότητα κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου *Salmonella enterica* σε υποστρώματα των οποίων το pH είχε ρυθμιστεί με οξικό οξύ συγκριτικά με εκείνα που είχαν υποστεί ρύθμιση με γαλακτικό οξύ, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται και στο πείραμα στενότερων ορίων. Ο μικροοργανισμός φαίνεται λοιπόν να υφίσταται τη θανατηφόρο επίδραση του γαλακτικού οξέος σε τιμές pH από 4.02 έως και 5.01, ενώ η ανάπτυξη ξεκινά από κατώτερη τιμή pH και a_w 5.22 και 0.960 αντίστοιχα. Σε τιμές pH 5.62, 5.82 και 6.03 η ανάπτυξη σταματά σε ελάχιστη ενεργότητα νερού 0.948. Η εικόνα της ανάπτυξης στην περίπτωση που γίνεται χρήση οξικού οξέος διαφοροποιείται από εκείνη στο γαλακτικό αφού η ανάπτυξη του στελέχους *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 ξεκινά από κατώτερη τιμή pH 5.41 και ελάχιστη ενεργότητα νερού 0.960, ενώ σε τιμές pH 5.61, 5.80 και 6.03 η ανάπτυξη σταματά σε κατώτερη τιμή a_w 0.952. Επιπλέον, ανάπτυξη δεν παρατηρήθηκε σε ενεργότητα νερού 0.942, σε κανένα συνδυασμό pH- a_w είτε στο γαλακτικό είτε στο οξικό οξύ.



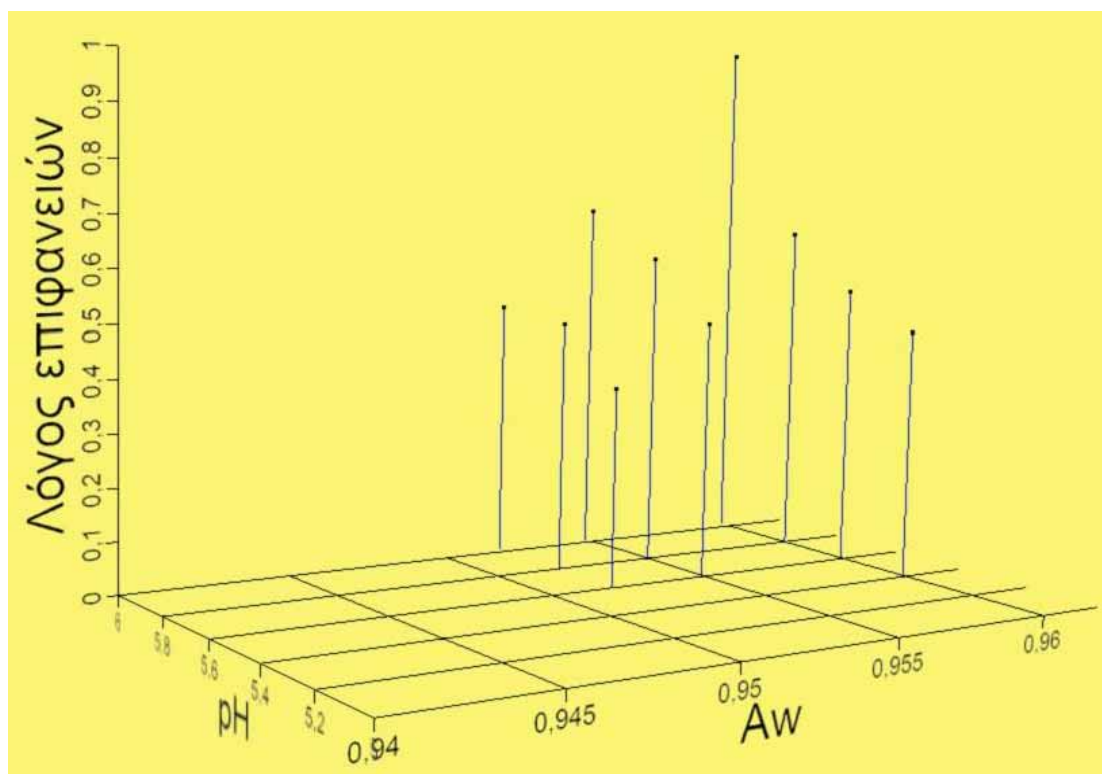
Σχήμα 24. Γραφική απεικόνιση ανάπτυξης-μη ανάπτυξης του βακτηρίου *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 σε υποστρώματα με διαβάθμιση του pH και της a_w (πείραμα στενότερων ορίων ανάπτυξης).

Κόκκινα σημεία = δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη στο συγκεκριμένο συνδυασμό pH - a_w
 Πράσινα σημεία = παρατηρήθηκε ανάπτυξη στο συγκεκριμένο συνδυασμό pH - a_w

Καλύτερη απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 παρέχεται στα τρισδιάστατα γραφήματα των σχημάτων 25 και 26 (γαλακτικό και οξικό οξύ αντίστοιχα). Από τα γραφήματα τεκμαίρεται ότι όσο αυξάνονται οι τιμές pH και a_w τόσο αυξάνεται και ο λόγος των επιφανειών λαμβάνοντας τη μέγιστη τιμή του, ίση με 1, στο ζεύγος pH- a_w : 6.03-0.960 και τόσο περισσότερο οι συνθήκες ανάπτυξης προσεγγίζουν την άριστη. Ο λόγος των επιφανειών εξάλλου αποτελεί ένα μέτρο σύγκρισης της ανάπτυξης του βακτηρίου σε κάθε ένα συνδυασμό pH- a_w με το συνδυασμό εκείνο που οδηγεί στη βέλτιστη ανάπτυξη. Η μικρότερη τιμή του λόγου των επιφανειών στο γαλακτικό οξύ, εντοπίζεται στα ζεύγη τιμών pH- a_w : 5.62-0.948, 5.82-0.948 και είναι ίση με 0.38, ενώ στο οξικό οξύ εντοπίζεται στο ζεύγος pH- a_w : 5.61-0.952 και είναι επίσης ίση με 0.38. Οι λόγοι των επιφανειών και στα δύο οργανικά οξέα κυμαίνονται στα ίδια περίπου χαμηλά επίπεδα αποκλίνοντας από τη μέγιστη τιμή (βέλτιστη ανάπτυξη), κάτι το οποίο σε συνδυασμό και με τις υψηλές κατώτερες τιμές a_w που απαιτούνται προκειμένου να αναπτυχθεί ο μικροοργανισμός, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το στέλεχος *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 παρουσιάζει μια αυξημένη ευαισθησία και μειωμένη (ή μηδενική) ανάπτυξη σε χαμηλές τιμές ενεργότητας νερού (συγκεντρώσεις NaCl >7%).



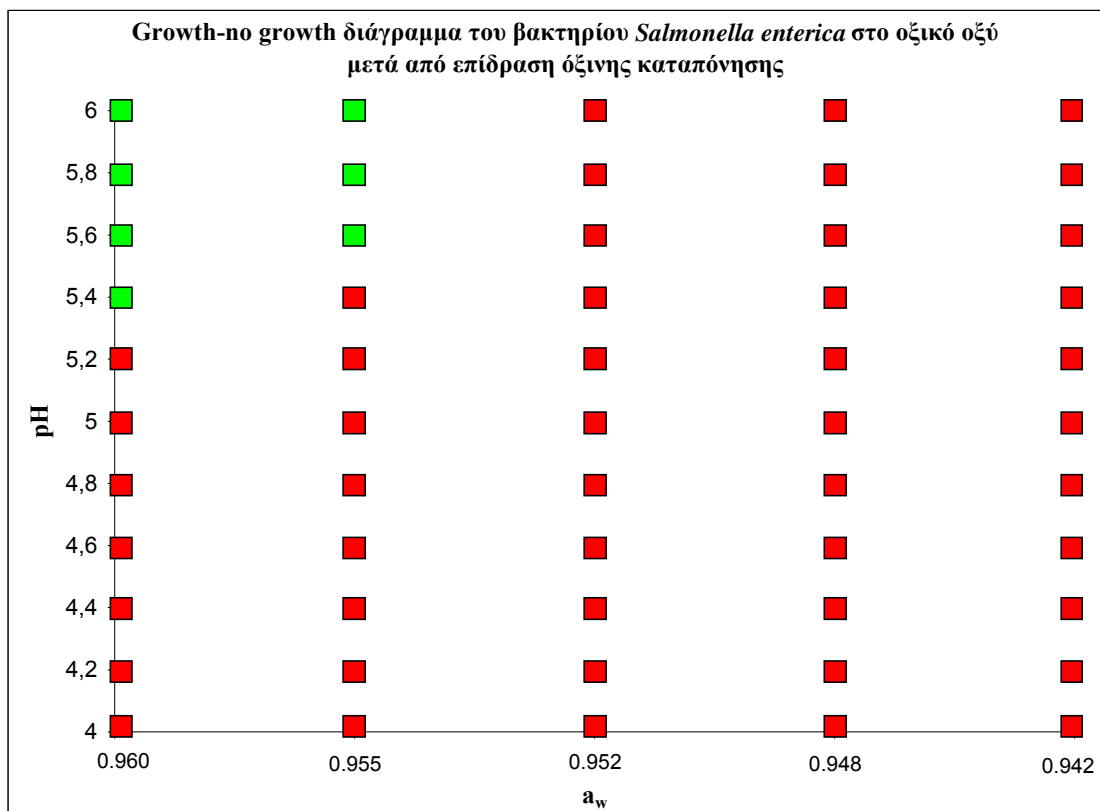
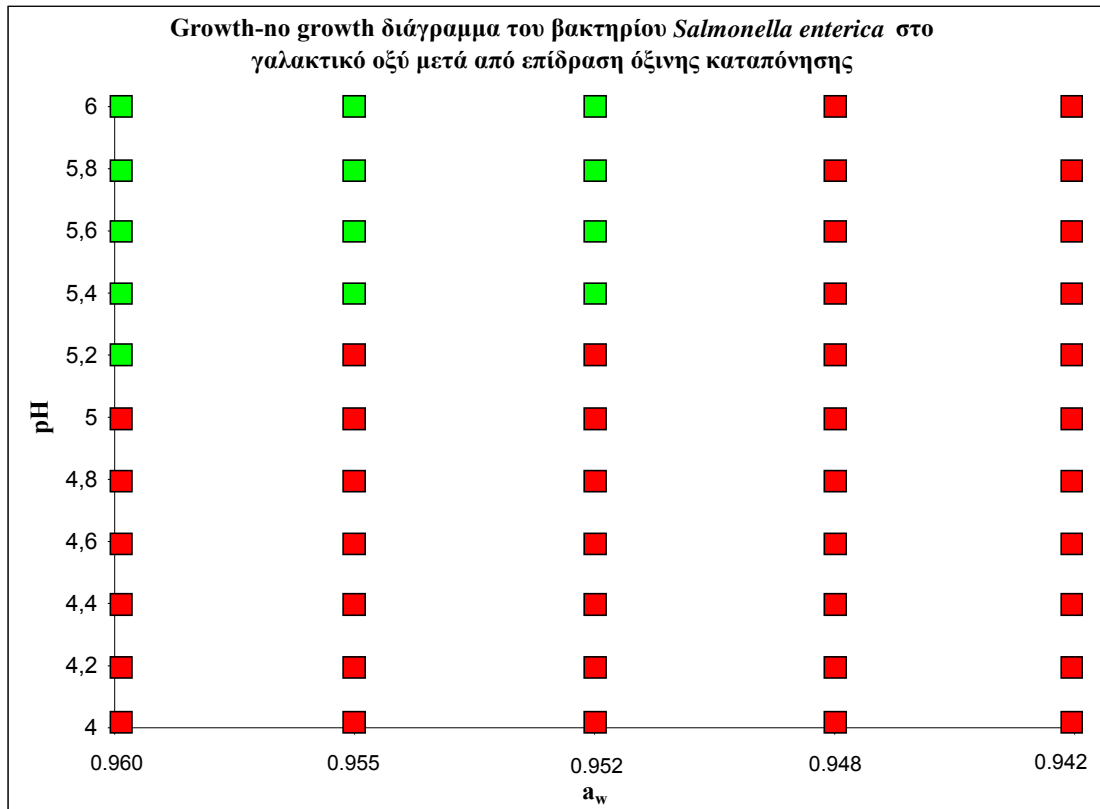
Σχήμα 25. Τρισδιάστατο συγκριτικό γράφημα τριών μεταβλητών (pH, a_w , λόγος επιφανειών). Απεικονίζεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 σε υποστρώματα των οποίων το pH έχει ρυθμιστεί με χρήση γαλακτικού οξέος.



Σχήμα 26. Τρισδιάστατο συγκριτικό γράφημα τριών μεταβλητών (pH, a_w , λόγος επιφανειών). Απεικονίζεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 σε υποστρώματα των οποίων το pH έχει ρυθμιστεί με χρήση οξικού οξέος.

3.3.2. Ανάπτυξη του στελέχους *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 κατόπιν προσαρμογής σε συνθήκες όξινης καταπόνησης – Σύγκριση με συνθήκες μη προσαρμογής

Στην προηγούμενη παράγραφο περιγράφηκε η ανάπτυξη του στελέχους *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 σε υποστρώματα με διαβάθμιση του pH και της ενεργότητας νερού χωρίς να έχει προηγηθεί προσαρμογή του σε συνθήκες όξινης καταπόνησης. Σ' αυτή την παράγραφο θα περιγραφεί η συμπεριφορά του βακτηρίου κατά τον ενοφθαλμισμό του στα ίδια υποστρώματα ανάπτυξης (Πίνακας 14 παρ. 3.1.1.) κατόπιν όμως προσαρμογής του σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (TSBYE pH 5.0) και επαγωγής της οξεοανθεκτικότητάς του. Παρατηρώντας τα Σχήματα 27, 28 και 29 που ακολουθούν και συγκρίνοντάς τα με τα αντίστοιχα Σχήματα 24, 25 και 26 της παραγράφου 3.3.1. γίνεται φανερό ότι η έκθεση του μικροοργανισμού *S. enterica* σε συνθήκες όξινης καταπόνησης, είχε ως αποτέλεσμα τη μη ικανότητα μετέπειτα ανάπτυξής της σε κάποιους από τους συνδυασμούς pH- a_w , που αρχικά (όταν δεν είχε υποστεί όξινη καταπόνηση) είχε αναπτυχθεί (Σχήμα 24). Παρατηρούμε ότι η ανάπτυξη στα υποστρώματα των οποίων το pH είχε ρυθμιστεί με



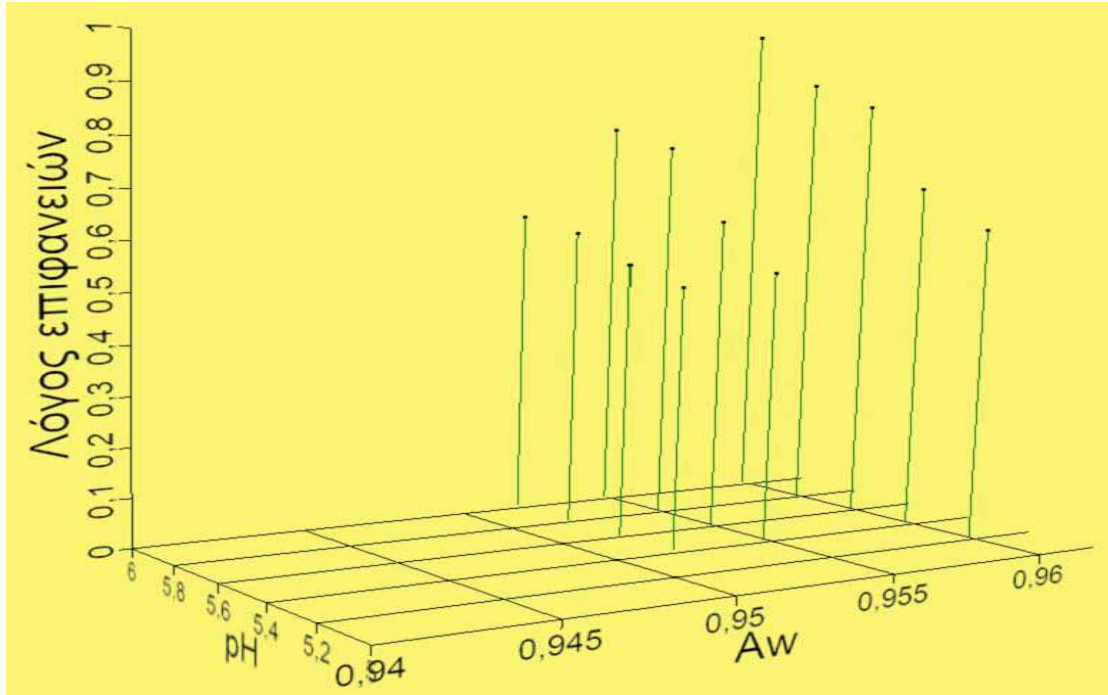
Σχήμα 27. Γραφική απεικόνιση ανάπτυξης-μη ανάπτυξης του βακτηρίου *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 σε υποστρώματα με διαβάθμιση του pH και της a_w κατόπιν επίδρασης όξινης καταπόνησης.

Κόκκινα σημεία = δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη στο συγκεκριμένο συνδυασμό pH - a_w
 Πράσινα σημεία = παρατηρήθηκε ανάπτυξη στο συγκεκριμένο συνδυασμό pH - a_w

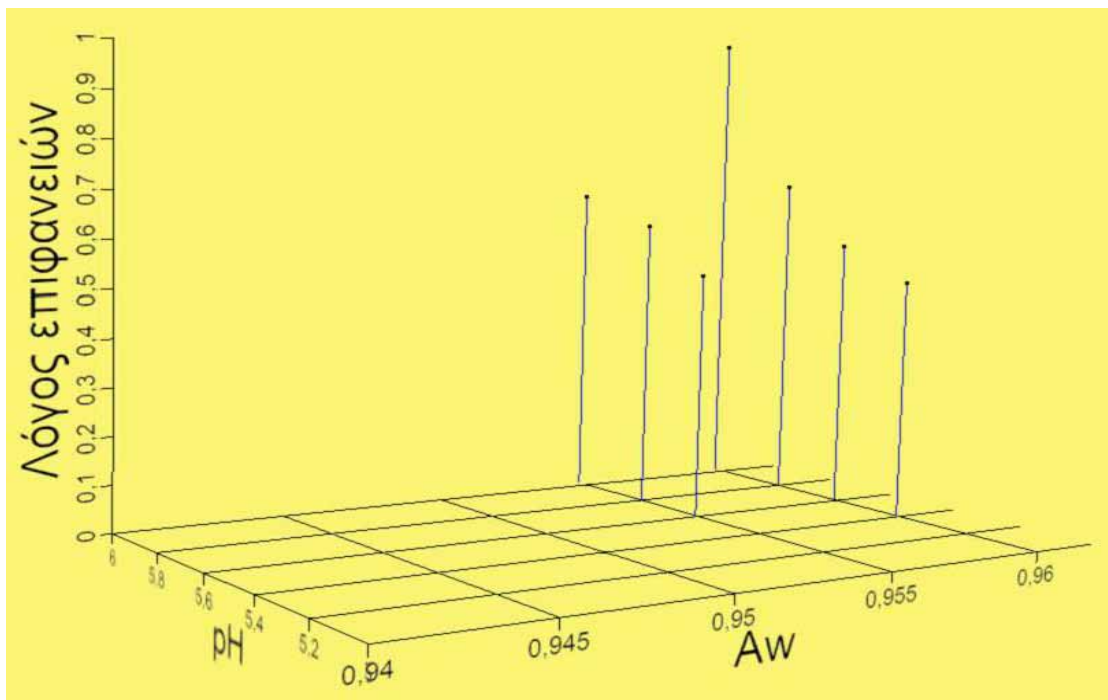
χρήση γαλακτικού οξέος ξεκινά από κατώτερη τιμή pH 5.22 και ελάχιστη ενεργότητα νερού 0.960 (όπως στην περίπτωση της μη προσαρμογής), ενώ σε τιμές pH από 5.43 έως και 6.03 ο μικροοργανισμός δεν φαίνεται να είναι ικανός να αναπτυχθεί σε ενεργότητα νερού χαμηλότερη από 0.952 (έναντι 0.948 στις συνθήκες μη προσαρμογής). Η ανεκτικότητα και το εύρος ανάπτυξης του βακτηρίου *S. enterica* στο οξικό οξύ, φαίνεται να είναι για μια ακόμη φορά μειωμένη σε σχέση με το γαλακτικό, με το ζεύγος pH- a_w : 5.41-0.960 να αποτελεί το συνδυασμό από τον οποίο ξεκινά η ανάπτυξη (όπως και στις συνθήκες μη προσαρμογής), αλλά σε τιμές pH από 5.61 έως και 6.03 να μην καθίσταται δυνατή κάτω από ενεργότητα νερού 0.955 (έναντι 0.952 στη μη προσαρμογή). Είναι προφανές ότι το στελέχος *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 κατόπιν προσαρμογής του στις συνθήκες όξινης καταπόνησης δεν κατορθώνει να ενισχύσει την οξεοανθεκτικότητά του, με αποτέλεσμα αφενός να μην δύναται να αναπτυχθεί – όπως θα αναμενόταν κανονικά – σε χαμηλότερες τιμές pH συγκριτικά με τις συνθήκες μη προσαρμογής και αφετέρου να μην επάγεται η ωσμοανθεκτικότητά του – όπως στην περίπτωση του στελέχους *L. monocytogenes* LQC 15015 (βλ. παρ. 3.2.2.) – η οποία θα συνέβαλλε στην επιβίωση του στελέχους σε χαμηλές τιμές ενεργότητας νερού. Αντίθετα, μετά την προσαρμογή η ανάπτυξη καθίσταται δυνατή μόνο σε υψηλότερες τιμές a_w συγκριτικά με την περίπτωση της μη προσαρμογής.

Όπως έχει ειπωθεί και σε προηγούμενες παραγράφους, η σύγκριση της ανάπτυξης σε έναν οποιονδήποτε συνδυασμό pH- a_w στο εκάστοτε οργανικό οξύ, με εκείνο το συνδυασμό pH- a_w που οδηγεί στην καλύτερη ανάπτυξη, πραγματοποιείται με το λόγο των αντίστοιχων επιφανειών των δύο καμπυλών ανάπτυξης. Ο λόγος αυτός έχει την έννοια του μέτρου σύγκρισης της ανάπτυξης και σε κάθε περίπτωση είναι μικρότερος ή ίσος της μονάδας. Στα τρισδιάστατα γραφήματα των σχημάτων 28 και 29 παρατηρούμε ότι στο μεν γαλακτικό οξύ, η μέγιστη τιμή του λόγου των επιφανειών, ίση με 1, εντοπίζεται στο ζεύγος τιμών pH- a_w : 6.03-0.960 και η μικρότερη 0.52 στο ζεύγος 5.43-0.952, ενώ στο δε οξικό η μέγιστη τιμή παρατηρείται επίσης στο ζεύγος τιμών pH- a_w : 6.03-0.960 και η μικρότερη 0.51 στο ζεύγος τιμών 5.41-0.960. Συγκριτικά με τις συνθήκες μη προσαρμογής, ο μικροοργανισμός *S. enterica* κατόπιν προσαρμογής του σε συνθήκες ήπια όξινης καταπόνησης, παρουσίασε όπως προαναφέρθηκε μειωμένο εύρος και ικανότητα ανάπτυξης σε χαμηλές τιμές ενεργότητας νερού, ενώ αντίθετα παρουσίασε υψηλές τιμές (>0.51) όσον αφορά στο λόγο των επιφανειών. Αυτό σημαίνει ότι στις συνθήκες προσαρμογής, η ανάπτυξη

του βακτηρίου στους διάφορους συνδυασμούς pH- a_w παρά το γεγονός ότι ήταν περιορισμένη, ήταν πιο κοντά στη βέλτιστη από τις συνθήκες μη προσαρμογής.



Σχήμα 28. Τρισδιάστατο συγκριτικό γράφημα τριών μεταβλητών (pH, a_w , λόγος επιφανειών). Απεικονίζεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 - μετά την επίδραση όξινης καταπόνησης - σε υποστρώματα των οποίων το pH έχει ρυθμιστεί με χρήση γαλακτικού οξέος.



Σχήμα 29. Τρισδιάστατο συγκριτικό γράφημα τριών μεταβλητών (pH, a_w , λόγος επιφανειών). Απεικονίζεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 - μετά την επίδραση όξινης καταπόνησης - σε υποστρώματα των οποίων το pH έχει ρυθμιστεί με χρήση οξικού οξέος.

3.3.3. Συζήτηση

Όταν οργανικά οξέα (γαλακτικό, οξικό, κιτρικό, προπιονικό κ.α.) χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά στα τρόφιμα, είναι σημαντικό να εξασφαλίζεται ότι η σωστή συγκέντρωση αδιάστατου οξέος (υπεύθυνου για την αντιμικροβιακή δράση του οξέος) είναι διαθέσιμη για την αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης. Στον Πίνακα 19 φαίνονται τα ποσοστά του κάθε οργανικού οξέος σε αδιάστατη μορφή, σε διαφορετικές τιμές pH. Το εύρος ανάπτυξης του στελέχους *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 όσον αφορά στο pH στην παρούσα εργασία, ήταν από 4 έως 6 ρυθμισμένο με γαλακτικό ή οξικό οξύ. Η μειωμένη ανάπτυξη του βακτηρίου στο οξικό οξύ συγκριτικά με το γαλακτικό – και για τις καλλιέργειες που είχαν υποστεί προσαρμογή αλλά και γι' αυτές που δεν είχαν – μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι εντός του προαναφερθέντος εύρους pH το ποσοστό του οξικού οξέος που παραμένει υπό αδιάστατη μορφή ήταν πολύ μεγαλύτερο από εκείνο του γαλακτικού (Πίνακας 19), καθιστώντας το πρώτο πιο αποτελεσματικό στη θανάτωση του μικροοργανισμού και στην εν γένει αντιμικροβιακή του δράση.

Πίνακας 19. Ποσοστά επί τοις εκατό οργανικών οξέων σε αδιάστατη μορφή σε διαφορετικές τιμές pH. [πηγή International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 1980)]

Οργανικό οξύ	Τιμή pH			
	4	5	6	7
Οξικό οξύ	84.5	34.9	5.1	0.54
Κιτρικό οξύ	18.9	0.41	0.006	<0.001
Γαλακτικό οξύ	39.2	6.05	0.64	0.064

Οι Chung και Goepfert (1970) ανέφεραν ότι η ελάχιστη τιμή pH, στην οποία ορισμένοι ορότυποι στελεχών *Salmonella* spp. θα ξεκινούσαν την ανάπτυξή τους υπό ιδανικές συνθήκες σε θρεπτικά μέσα των οποίων το pH θα είχε ρυθμιστεί με διαφορετικά οξέα, ήταν 4.05 (κιτρικό οξύ), 4.2 (γλυκονικό οξύ), 4.3 (μηλικό οξύ), 4.4 (γαλακτικό οξύ), 4.7 (γλουταρικό οξύ – glutaric acid) και 5.4 (οξικό οξύ). Έχει αποδειχθεί ότι ο τύπος του οργανικού οξέος που χρησιμοποιείται επηρεάζει την ανθεκτικότητα στην όξινη καταπόνηση. Σε τιμές pH που δεν επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ο ρυθμός θανάτου ήταν ταχύτερος σε υψηλότερες θερμοκρασίες επώασης (43°C). Οι Jung και Beuchat (2000) παρουσίασαν μια μελέτη επιβίωσης τεσσάρων στελεχών *S. typhimurium* DT104 και τεσσάρων στελεχών μη-

DT104, χρησιμοποιώντας και πάλι ένα μικροβιολογικό μέσο ανάπτυξης στο οποίο το pH είχε ρυθμιστεί με διαφορετικά οργανικά οξέα. Επιβεβαίωσαν ότι σε ένα δεδομένο εύρος pH, το οξικό οξύ ήταν το πιο ανασταλτικό της ανάπτυξης οργανικό οξύ από εκείνα που εξετάστηκαν, κάτι το οποίο ισχύει και για την παρούσα εργασία, αλλά είναι αντίθετο με τα αποτελέσματα των Jung et al. (2009) οι οποίοι έδειξαν ότι μεταξύ των γαλακτικό και οξικό στην ίδια συγκέντρωση (0.3% ή 0.5%), το πρώτο προκαλούσε τραυματισμό σε μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων *S. typhimurium* από το δεύτερο. Εντούτοις, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των Chung και Goerfert (1970), σε pH 4.0, το κιτρικό οξύ βρέθηκε να είναι πιο ανασταλτικό από το μηλικό οξύ, ενώ ζωντανά κύτταρα μπορούσαν να ανιχνευθούν ακόμα και σε pH 3.7 στο θρεπτικό μέσο του οποίου το pH είχε υποστεί ρύθμιση με κάποιο από τα δύο οξέα. Οι Membre et al., (1997) εξέτασαν τα αποτελέσματα της θερμοκρασίας αποθήκευσης (15-35°C), του pH (4.5-6.5), του επιπέδου γλυκόζης (1-4% w/v) και του επιπέδου κιτρικού οξέος (0.05-0.1% w/v) στη μαγιονέζα μειωμένων θερμίδων που εμβολιάστηκε με ένα στέλεχος *S. typhimurium* που είχε απομονωθεί από προϊόντα με βάση τα αυγά. Ανέφεραν ότι οποιεσδήποτε συνθήκες και αν εφαρμόστηκαν, ο βιώσιμος πληθυσμός μειώθηκε, αλλά μόνο μετά από μια χρονική περίοδο που κυμαινόταν από 11 έως 85 ημέρες, καταδεικνύοντας έτσι ένα πιθανό κίνδυνο για την ασφάλεια των τροφίμων, ιδιαίτερα εκείνων των οποίων η παρασκευή απαιτεί ωμά αυγά. Επιπλέον μελέτες της επιβίωσης του γένους *Salmonella* spp. (τεσσάρων οροτύπων) κατόπιν ενοφθαλμισμού σε πορτοκαλοχυμό και αποθήκευσης στους 0°C, έδειξαν ότι θα μπορούσαν να ανιχνευθούν μέχρι και μετά από 27 ημέρες σε pH 3.5, 46 ημέρες σε pH 3.8, 60 ημέρες σε pH 4.1 και 73 σε pH 4.4 (Parish et al., 1997). Επίσης βάσει πειραμάτων των Cook et al., (1998) παρατηρήθηκε μείωση 4 λογαριθμικών κύκλων μετά από 27 ημέρες ενός πληθυσμού 10⁶ κυττάρων *Salmonella*, ο οποίος είχε ενοφθαλμιστεί σε πορτοκαλοχυμό με pH 3.0-3.1 και διατηρούνταν στους 5°C.

Τα συνολικά αποτελέσματα μελετών οι οποίες έχουν πραγματοποιηθεί, επιβεβαιώνουν ότι η ανθεκτικότητα σε συνθήκες όξινης καταπόνησης είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο στενά συνδεδεμένο με την επίδραση διαφορετικών περιβαλλοντικών παραγόντων οι οποίοι υπερισχύουν κατά την προσαρμογή. Η αλληλεπίδραση όλων αυτών των παραγόντων καθώς επίσης και άγνωστων παραγόντων, μπορούν να δώσουν μια πρώτη εξήγηση για τα προφανώς αντιφατικά αποτελέσματα που περιγράφονται στη βιβλιογραφία και με τα οποία συμφωνεί και η

παρούσα μελέτη. Έτσι οι Greenacre et al. (2003) χρησιμοποιώντας TSB του οποίου το pH ρυθμίστηκε είτε με οξικό είτε με γαλακτικό οξύ, διαπίστωσαν ότι το οξικό οξύ ήταν αποδοτικότερο από το γαλακτικό οξύ στην επαγωγή της ανθεκτικότητας του μικροοργανισμού *S. typhimurium*. Οι ίδιοι ερευνητές τρία χρόνια αργότερα (Greenacre et al., 2006) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι προτέρα έκθεση του βακτηρίου *Salmonella* στο γαλακτικό οξύ (pH 5.5 για 3h) είχε ως αποτέλεσμα υπερευαισθησία της στην ωσμωτική καταπόνηση (a_w 0.91), σε αντίθεση με την προσαρμογή στο οξικό οξύ (pH 5.5 για 2h). Επίσης οι Yuk και Schneider (2006) αξιολογώντας την ανθεκτικότητα πέντε οροτύπων *Salmonella* spp. που είχαν υποστεί προσαρμογή αφενός σε TSB, το οποίο περιείχε γλυκόζη σε ποσοστό 1.25% και αφετέρου σε διάφορα προϊόντα φρούτων (χυμοί μήλων, πορτοκαλιών και τομάτας) έδειξαν ότι τα κύτταρα που προσαρμόστηκαν στους χυμούς μήλων και τομάτας, με κυρίαρχο το μηλικό οξύ, παρουσίασαν αυξημένη οξεοανθεκτικότητα έναντι εκείνων που προσαρμόστηκαν σε χυμό πορτοκαλιού, με κυρίαρχο το κιτρικό οξύ. Αντίθετα η μελέτη των Baik et al. (1996) έδειξε ότι μετά την προσαρμογή του βακτηρίου *S. typhimurium* δεν υπήρξε ενίσχυση της οξεοανθεκτικότητάς του σε περιβάλλον παρουσία οξικού, βενζοϊκού ή προπιονικού οξέος, μια παρατήρηση που συνάδει με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας όπου η προσαρμογή του στελέχους *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 σε συνθήκες όξινης καταπόνησης – με χρήση γαλακτικού οξέος – δεν αύξησε την οξεοανθεκτικότητά του μικροοργανισμού και επιπλέον μείωσε και την ανεκτικότητά του σε χαμηλές τιμές a_w . Στη μελέτη των Álvarez-Ordóñez et al. (2009) όλες οι βακτηριακές καλλιέργειες που υπέστησαν προσαρμογή σε BHI broth με διάφορες τιμές pH (6.4 και 5.4), επέδειξαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε pH 3.0 από τις μη προσαρμοσμένες, παρά το γεγονός ότι η ικανότητα επιβίωσης στην τόσο ακραία αυτή τιμή pH (3.0) εξαρτιόταν από το οξύ που είχε χρησιμοποιηθεί για τη ρύθμιση του στο μέσο ανάπτυξης, με το κιτρικό και οξικό οξύ να είναι αυτά που προκάλεσαν την ισχυρότερη ανθεκτικότητα. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να έχει σοβαρό αντίκτυπο στην ασφάλεια των τροφίμων δεδομένου ότι τα οργανικά οξέα γαλακτικό, οξικό και κιτρικό χρησιμοποιούνται ως τα συνηθέστερα μέσα εξυγίανσης των σφαγίων (Smulders et al., 1998) αλλά και ως συντηρητικά στη βιομηχανία των τροφίμων.

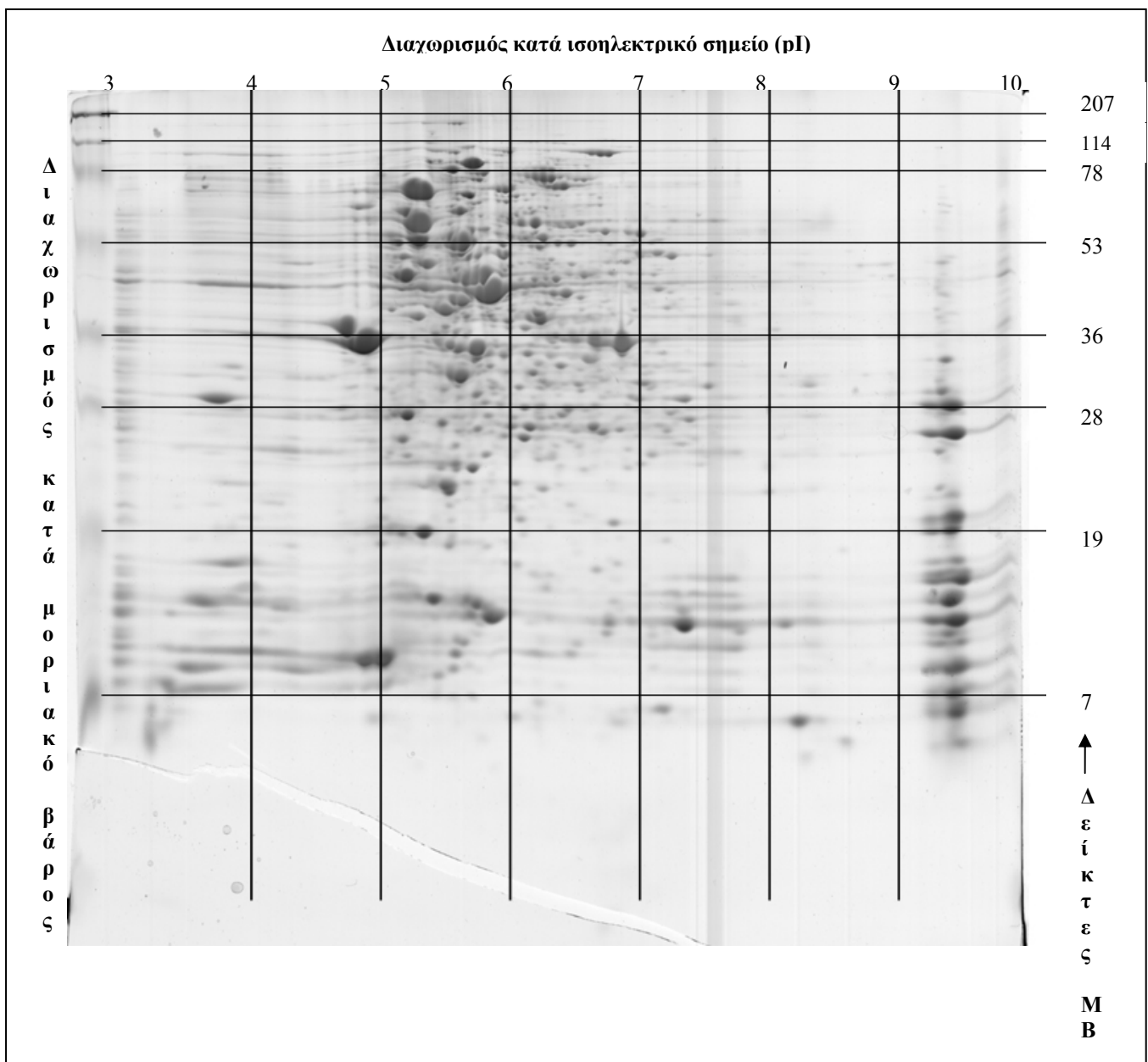
Στη μελέτη των Tiganitas et al. (2009) ο μικροοργανισμός *S. typhimurium* φάνηκε να είναι πιο ευάλωτος στη διαδοχική παρά στην ταυτόχρονη εφαρμογή εμποδίων, όπως pH 4.0 και έπειτα NaCl 15% ή 20%, συγκριτικά με το βακτήριο *L.*

monocytogenes. Αντίθετα στην περίπτωση διαδοχικής εφαρμογής τους και πάλι, αλλά με πρώτο εμπόδιο pH 4.5 και δεύτερο NaCl 20% το βακτήριο *S. typhimurium* επιβίωσε καλύτερα από το μικροοργανισμό *L. monocytogenes*. Είναι γνωστό παρ'αυτά ότι η ταυτόχρονη ή σταδιακή έκθεση βακτηρίων σε πολλαπλούς στρεσογόνους παράγοντες (hurdles) έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολική εξουθένωση ή τη διαταραχή της ομοιόστασής τους, ακολουθούμενη από κυτταρικό θάνατο (Leistner, 2000). Με αυτή την άποψη φαίνεται να συμφωνεί και η εργασία των Calicioglu et al. (2003) οι οποίοι παρατήρησαν ότι τα κύτταρα που είχαν υποστεί προσαρμογή σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (TSB με προσθήκη γλυκόζης 1% και pH 5.1) ήταν πιο ευάλωτα μετέπειτα κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες ξήρανσης (χαμηλή a_w) ή/και ήπια όξινου περιβάλλοντος (pH 4.3) από τα κύτταρα *Salmonella* που δεν είχαν υποστεί προσαρμογή. Παρόμοια αποτελέσματα για το βακτήριο *Salmonella* και άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς αναφέρθηκαν κι από άλλους ερευνητές (Dickson και Kunduru, 1995· Leyer και Johnson, 1997· Ryu et al., 1999· Casadei et al., 2001). Για παράδειγμα οι Dickson και Kunduru (1995) ανέφεραν ότι τα κύτταρα *Salmonella* που είχαν υποστεί προσαρμογή συγκριτικά με τα μη προσαρμοσμένα, είχαν αποκτήσει ίση ή μεγαλύτερη ευαισθησία σε οργανικά οξέα ενώ οι Ryu et al. (1999) ανέφεραν με τη σειρά τους ότι δεν υπήρχε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ προσαρμοσμένων και μη κυττάρων *E. coli* O157:H7 κατά την αποθήκευση αποξηραμένης σκόνης βόειου κρέατος. Βάσει των αποτελεσμάτων της, η παρούσα εργασία κινείται στο ίδιο ακριβώς πλαίσιο, αφού μετά από την προσαρμογή που υπέστη (βλ. παρ. 3.3.1. και 3.3.2.) το στέλεχος *S. enterica* serovar Typhimurium LQC 15100, αφενός δεν παρατηρήθηκε αύξηση της ανθεκτικότητας του σε χαμηλότερες τιμές pH – είτε στο γαλακτικό είτε στο οξικό οξύ – και αφετέρου δεν παρατηρήθηκε επαγωγή της διασταυρούμενης προστασίας (cross-protection) που θα παρείχε ανθεκτικότητα και σε χαμηλότερες τιμές ενεργότητας νερού.

3.3.4. Επίδραση στο πρωτέωμα

Η επίδραση της προσαρμογής σε συνθήκες όξινης καταπόνησης επί του πρωτεώματος του στελέχους *S. enterica* serovar Typhimurium LQC 15100, αξιολογήθηκε όπως και στην περίπτωση των προηγούμενων στελεχών, με χρήση ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμιδίου δύο διαστάσεων (2D GE) σε συνδυασμό με το λογισμικό ηλεκτρονικού υπολογιστή PDQuest Advanced 8.0.1 (BIO-RAD) και τη βοήθεια σαρωτή-μετρητή οπτικής πυκνότητας πηκτών πολυακρυλαμιδίου (GS 800 Calibrated Densitometer, BIO-RAD).

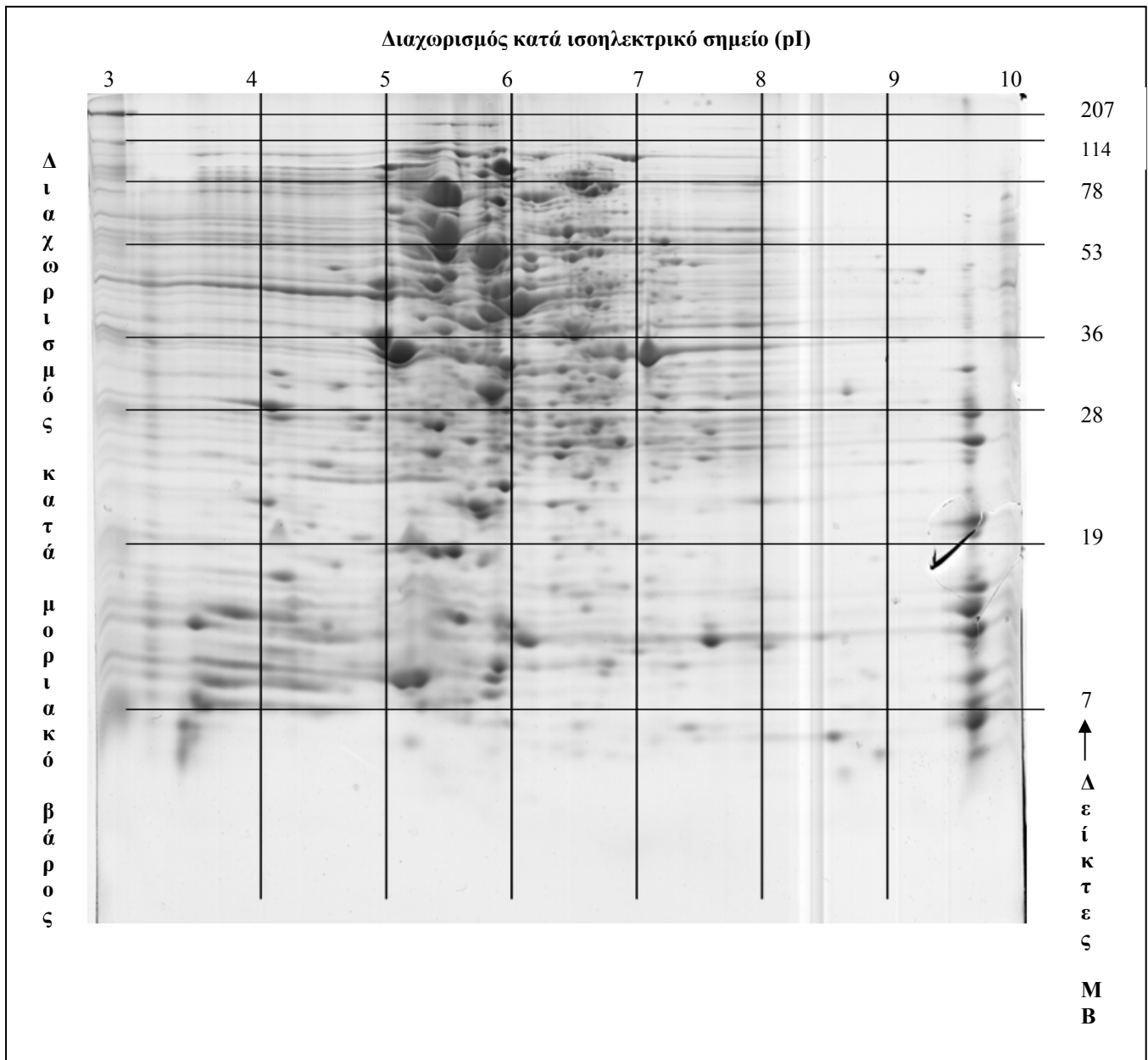
3.3.4.1. Πρωτεϊνική κατατομή σε συνθήκες μη προσαρμογής



Σχήμα 30. Επίδραση συνθηκών μη προσαρμογής (pH 7.0) στο πρωτέωμα του βακτηρίου *S. enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 μετά από ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου δύο διαστάσεων.

Στο Σχήμα 30 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της 2D SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης των εν μέσω λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης, κυττάρων του στελέχους *S. enterica* serovar Typhimurium LQC 15100, χωρίς προηγουμένως να έχουν υποστεί προσαρμογή σε συνθήκες ήπια όξινης καταπόνησης.

3.3.4.2. Πρωτεϊνική κατατομή σε συνθήκες όξινης προσαρμογής

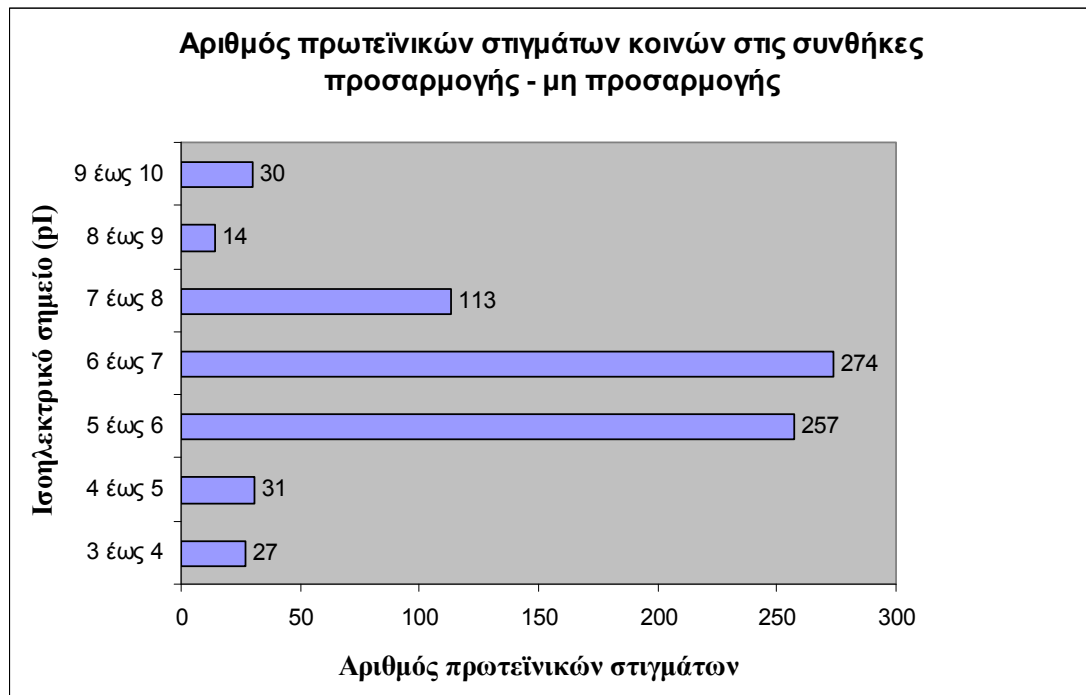


Σχήμα 31. Επίδραση συνθηκών όξινης προσαρμογής (pH 5.0) στο πρωτέωμα του βακτηρίου *S. enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 μετά από ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδιου δύο διαστάσεων.

Μετά την προσαρμογή του στελέχους *S. enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (pH 5.0), η πρωτεϊνική κατατομή (πρωτέωμα) του βακτηρίου παρουσιάζει την εικόνα του Σχήματος 31.

3.3.4.3. Σύγκριση μεταξύ συνθηκών προσαρμογής και μη προσαρμογής και ταυτοποίηση πρωτεϊνών

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων που λαμβάνουμε από τις ηλεκτροφορήσεις πραγματοποιείται όπως προαναφέρθηκε, με σάρωση και ταυτόχρονη επεξεργασία των αποτυπωμένων επί των πηκτών της ηλεκτροφόρησης πρωτεωμάτων, με το λογισμικό ηλεκτρονικού υπολογιστή PDQuest Advanced 8.0.1 της BIO-RAD. Ο εντοπισμός ομοιοτήτων ή διαφορών έγκειται στην εύρεση πρωτεϊνικών στιγμάτων κοινά απαντώμενων τόσο σε συνθήκες προσαρμογής όσο και μη προσαρμογής, αλλά και στην εύρεση μοναδικών πρωτεϊνικών στιγμάτων που εμφανίζονται μόνο σε μια εκ των δύο περιπτώσεων. Ο αριθμός των κοινών πρωτεϊνικών στιγμάτων που εμφανίστηκαν στις περιπτώσεις προσαρμογής και μη προσαρμογής παρουσιάζονται στο ραβδόγραμμα του Σχήματος 32.



Σχήμα 32. Αριθμός κοινών πρωτεϊνικών στιγμάτων (των συνθηκών προσαρμογής – μη προσαρμογής) που αντιστοιχούν σε ένα εύρος τιμών ισοηλεκτρικού σημείου (pI) και προέκυψαν μετά από επεξεργασία με το λογισμικό PDQuest Advanced 8.0.1 της BIO-RAD.

Αναλυτική παρουσίαση θα ακολουθήσει μόνο για εκείνα τα στίγματα και τις αντιστοιχούσες σ'αυτά πρωτεΐνες, που εμφανίστηκαν στην περίπτωση μη προσαρμογής (pH 7.0) (Πίνακας 20), αφού πέραν των κοινών πρωτεϊνικών στιγμάτων μεταξύ των συνθηκών προσαρμογής – μη προσαρμογής δεν ανιχνεύθηκαν επαγόμενες πρωτεΐνες στην περίπτωση προσαρμογής σε συνθήκες ήπια όξινης καταπόνησης (pH 5.0). Αντίθετα με την περίπτωση του στελέχους *Listeria*

monocytogenes LQC 15015 (παρ. 3.2.4.3.), αυτή η μονομερής έκφραση πρωτεϊνών που παρατηρείται στο στέλεχος *S. enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 πιθανότατα να είναι και η εξήγηση για τη μείωση η οποία παρατηρήθηκε στην ανεκτικότητα του βακτηρίου σε χαμηλές τιμές ενεργότητας νερού (βλ. Σχήματα 24 και 27).

Κάθε ένα από τα εμφανισθέντα πρωτεϊνικά στίγματα επί της πηκτής της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων, αντιστοιχεί σε μια ή περισσότερες πρωτεΐνες, με γνωστά στοιχεία το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) και το μοριακό βάρος (σε kDa) – οριζόντιος και κάθετος άξονας αντίστοιχα των σχημάτων 30 και 31 – του κάθε στίγματος. Ο ποιοτικός προσδιορισμός των στιγμάτων που προέκυψαν, πραγματοποιήθηκε για μια ακόμη φορά με αναζήτηση των αντιστοιχουσών πρωτεϊνών στην ηλεκτρονική βάση δεδομένων EXPASY (<http://ca.expasy.org/tools/tagident.html>). Τα αποτελέσματα της αναζήτησης φαίνονται στον Πίνακα 20.

Πίνακας 20. Αποτελέσματα αναζήτησης στη βάση δεδομένων EXPASY για τον ποιοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών προερχόμενων από πρωτεϊνικά στίγματα, κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου *S. enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 σε συνθήκες μη προσαρμογής (pH 7.0).

Κωδικός στίγματος	Στοιχεία στίγματος		Πιθανές πρωτεΐνες	Γονίδιο
	Μοριακό βάρος (kDa)	Ισοηλεκτρικό σημείο (pI)		
2508	60.57	4.68	Κυτοπλασμική α-αμυλάση (μεταβολισμός υδατανθράκων)	-
2213	20.04	5.01	Φωσφοριβοζυλο-τρανσφεράση της υποξανθίνης (μεταφορά υπολειμμάτων σακχάρων)	hpt
			Πρωτεΐνη YieF	-
3422	35.49	5.44	Οξειδοαναγωγή του NADH hcr Περιπλασμική πρωτεΐνη-μεταφορέας ψευδαργύρου ABC	hcr znuA
3322	28.76	5.50	3 μέθυλο-2 οξοβουτανοϊκή υδροξυμεθυλοτρανσφεράση Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	panB -
3220	19.90	5.56	Πιθανή πρωτεΐνη τριχιδίων	-
4106	12.71	5.71	Πρωτεΐνη σύνθεσης πολυκετιδίου	ORF
4110	14.04	5.78	Πρωτεΐνη YffB (οξειδοαναγωγή)	-

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4112	12.54	5.79	Πρωτεΐνη W Θεωρούμενη πρωτεΐνη εσωτερικής μεμβράνης	ORF -
4212	21.80	5.84	Μεταγραφικός ρυθμιστής TetR Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη (ρύθμιση μεταγραφής DNA)	ORF -
4215	24.40	5.85	Αφυδρογονάση SDR μικρής αλύσου Πρωτεΐνη εσωτερικής μεμβράνης YebE	- -
4216	18.39	5.86	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη Δισμουτάση υπεροξειδίου χαλκού/ψευδαργύρου	- sodC
4330	26.17	5.89	TtmH μεθυλοτρανσφεράση RNA ομάδας 1 2-διϋδρο-3-δεοξυφωσφογλυκονική αλδολάση	- -
4628	84.08	5.97	Υποδοχέας φερριεντεροβακτίνης α-υπομονάδα ριβονουκλεοσιδικής διφωσφορικής αναγωγής	ORF nrdA
4222	25.87	6.01	Θεωρούμενος μεταγραφικός ρυθμιστής GbtR	ORF
4339	31.52	6.02	Αφυδρογονάση του μηλικού (οξείδωση του μηλικού σε οξαλοξικό οξύ) Συνθετάση του παντοθενικού	mdh panC
4224	18.62	6.03	Συνθετάση του 2-C-μεθυλο-D-ερυθριτόλη 2,4-κυκλοδιφωσφορικού οξέος (βιοσύνθεση τερπενοειδών) Δισμουτάση υπεροξειδίου χαλκού/ψευδαργύρου	ispF sodC
4430	36.82	6.04	Μεταγραφικός ρυθμιστής οικογένειας LysR Πρωτεΐνη SpaN	- spaN
5201	20.74	6.06	Καταστολέας μεταγραφής MprA Αδενοσυλο-τρανσφεράση της κοβαλαμίνης	mprA btuR
5401	42.38	6.06	Λιποπρωτεΐνη Πρωτεΐνη επανάληψης τετρατρικοπεπτιδίου	- ORF
5603	77.37	6.06	Πρωτεΐνη Ggdef περιοχής Πρωτεΐνη-δέκτης εξωτερικής μεμβράνης μεταφοράς ενώσεων του σιδήρου	- ORF

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5203	24.25	6.07	Πρωτεΐνη Gp17 Πρωτεΐνη queC βιοσύνθεσης κουοσίνης (queuosine) παραγώγου της γουανοσίνης που απαντάται στο tRNA.	- queC
5101	10.84	6.08	Θεωρούμενη μεμβρανική πρωτεΐνη	-
5104	13.19	6.26	Θεωρούμενη πρωτεΐνη βακτηριοφάγου Πρωτεΐνη YffB (οξειδοαναγωγή)	- -
6205	25.08	6.61	Κυτιδύλοτρανσφεράση του 2-C-μεθυλο-D-ερυθριτόλη 4-φωσφορικού οξέος (βιοσύνθεση ισοπρενοειδών) 3-οξοακυλο-αναγωγή βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων	ispD fabG
7610	75.12	7.28	Κυκλική φωσφοδιεστεράση του διγουανυλικού	ORF
7519	66.63	7.50	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	-
7114	15.88	7.56	Πρωτεΐνη GFA ενεργοποίησης φορμαλδεϋδης εξαρτώμενη από τη γλουταθειόνη (κατάλυση αποδόμησης H ₂ S)	ORF
7423	44.60	7.87	Μεμβρανική πρωτεΐνη αντλίας αρσενικού Πρωτεΐνη επανάληψης TolB συστήματος Tol-Pal (μεταφορά πρωτεϊνών)	ORF tolB
8201	23.53	8.17	Ισομεράση του μαλεΐλοξοοξικού (μεταβολισμός αρωματικών αμινοξέων) Πρωτεΐνη αξιοποίησης προπανοδιόλης	maiA ORF
8403	36.32	8.23	Μεταγραφικός ρυθμιστής οικογένειας LysR	-

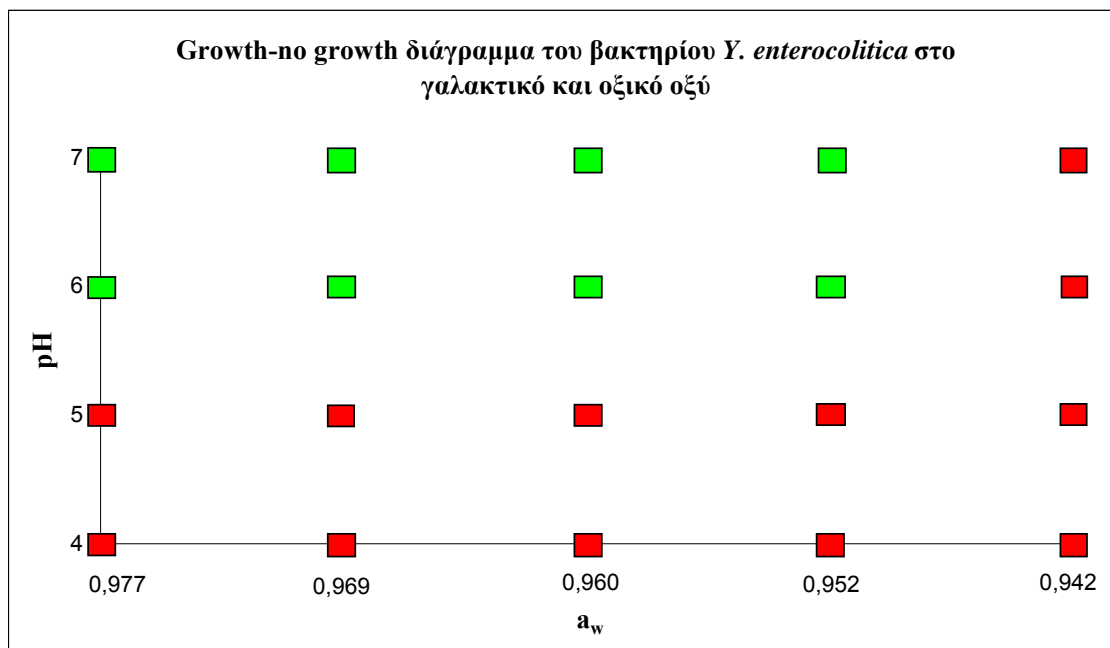
Από τον Πίνακα 20 βγαίνει το συμπέρασμα ότι κατά την ανάπτυξη του στελέχους *S. enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 στις συνθήκες μη προσαρμογής (pH 7.0) υπήρξε επαγωγή ενός πλήθους πρωτεϊνών (και ενζύμων), γεγονός το οποίο υποδηλώνει περαιτέρω εμπλοκή τους σε διάφορες μεταβολικές διεργασίες έκφρασης γονιδίων και επαγωγής επιπλέον πρωτεϊνών. Εξ αυτών ξεχωρίζει ο μεταγραφικός ρυθμιστής της οικογένειας ρυθμιστικών πρωτεϊνών LysR, με μοριακό βάρος περίπου 36 kDa. Η ομάδα αυτή των πρωτεϊνών και συγκεκριμένα η πρωτεΐνη CysB, έχει αποδειχθεί από αναλύσεις μετάλλαξης που έχουν πραγματοποιηθεί, ότι είναι απαραίτητη για την επαγωγή της οξεοανθεκτικότητας του μικροοργανισμού *E. coli*.

Στην παρούσα όμως εργασία ο μεταγραφικός ρυθμιστής ανιχνεύθηκε σε συνθήκες μη προσαρμογής, κάτι το οποίο πιθανότατα αποτελεί ένδειξη ότι δεν πρόκειται για την πρωτεΐνη CysB η οποία προκαλεί επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *adiA*.

3.4. Επίδραση των πειραματικών συνθηκών επί του στελέχους *Yersinia enterocolitica* CITY 650

3.4.1. Ανάπτυξη του στελέχους *Yersinia enterocolitica* CITY 650

Όπως στην περίπτωση των υπολοίπων τριών στελεχών των οποίων μελετήθηκε η ανάπτυξη, έτσι και με το στέλεχος *Yersinia enterocolitica* CITY 650, οι συνδυασμοί pH και a_w των υποστρωμάτων στα οποία ενοφθαλμίστηκε ο μικροοργανισμός φαίνονται στον Πίνακα 14 της παραγράφου 3.1.1.

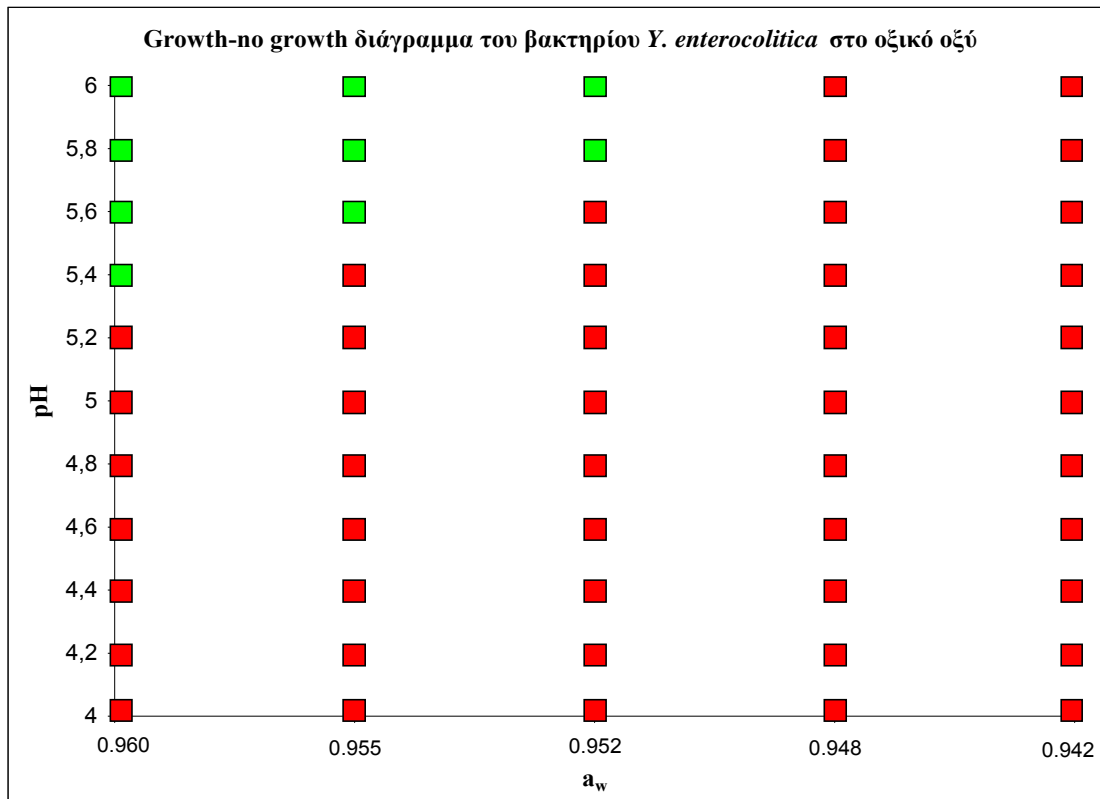
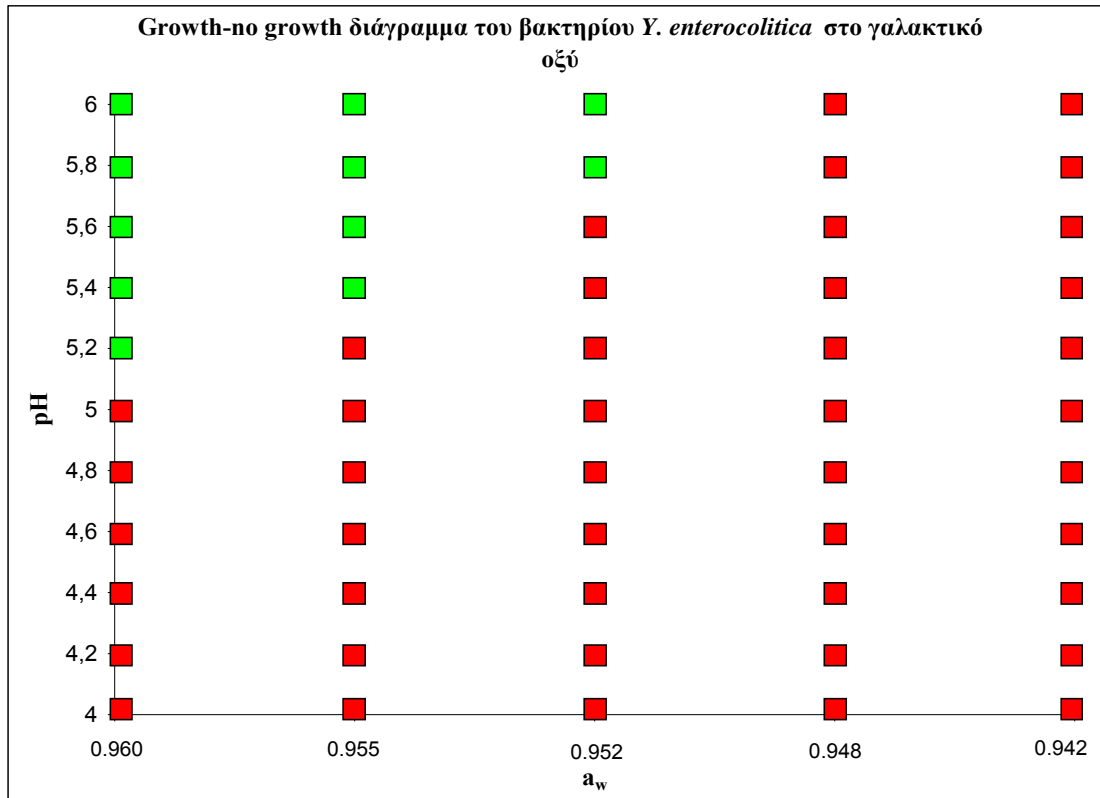


Σχήμα 33. Γραφική απεικόνιση ανάπτυξης-μη ανάπτυξης του βακτηρίου *Yersinia enterocolitica* CITY 650 σε υποστρώματα με διαβάθμιση του pH και της a_w (προκαταρκτικό πείραμα). Κόκκινα σημεία = δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη στο συγκεκριμένο συνδυασμό pH - a_w . Πράσινα σημεία = παρατηρήθηκε ανάπτυξη στο συγκεκριμένο συνδυασμό pH - a_w .

Από την ανάπτυξη ή μη του στελέχους *Yersinia enterocolitica* CITY 650 στα υποστρώματα του Πίνακα 14 (προκαταρκτικό πείραμα) προκύπτει η απεικόνιση της ανάπτυξης-μη ανάπτυξης (growth-no growth interface) του Σχήματος 33. Όσον αφορά στο προκαταρκτικό πείραμα ευρέων ορίων, το βακτήριο *Yersinia enterocolitica* κατάφερε να αναπτυχθεί στους ίδιους ακριβώς συνδυασμούς pH- a_w , είτε το pH των υποστρωμάτων είχε ρυθμιστεί με χρήση γαλακτικού είτε είχε ρυθμιστεί με χρήση οξικού οξέος. Και στα δύο λοιπόν οργανικά οξέα, ανάπτυξη παρατηρήθηκε σε τιμές pH από 6 έως και 7 και ενεργότητες νερού από 0.977 (NaCl

4% w/v) έως και 0.952 (NaCl 6% w/v). Όπως και στην περίπτωση των τριών προηγούμενων στελεχών έτσι και με το στέλεχος *Yersinia enterocolitica* CITY 650 το προκαταρκτικό πείραμα δεν είναι ικανό από μόνο του να δώσει πλήρη εικόνα του εύρους ανάπτυξης του μικροοργανισμού, οπότε θα μελετηθεί σε ένα στενότερο εύρος τιμών pH και a_w όπως αυτό παρουσιάζεται στον Πίνακα 14 της παραγράφου 3.1.1.. Η απεικόνιση της ανάπτυξης–μη ανάπτυξης (growth–no growth interface) του βακτηρίου *Y. enterocolitica* στο νέο εύρος τιμών pH και ενεργότητας νερού παρουσιάζεται στο Σχήμα 34.

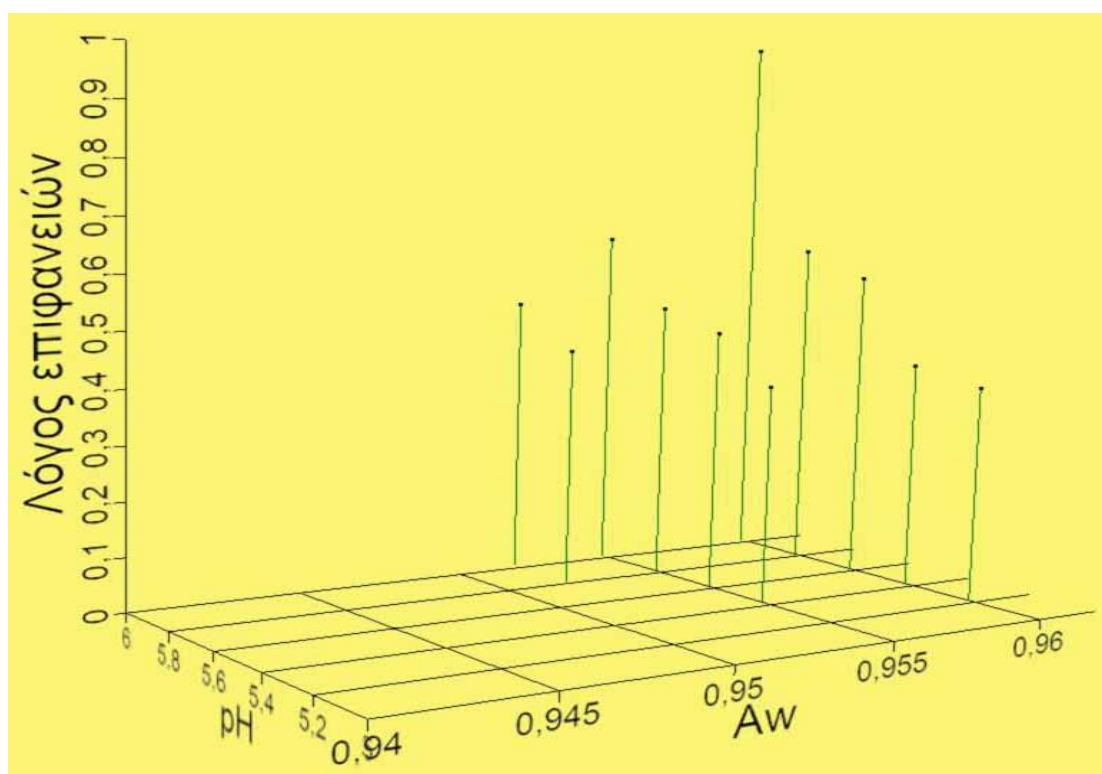
Στο πείραμα στενότερων ορίων, παρατηρήθηκε η μειωμένη ανθεκτικότητα του στελέχους *Yersinia enterocolitica* CITY 650 κατά την ανάπτυξή του σε υποστρώματα, των οποίων το pH είχε ρυθμιστεί με οξικό οξύ συγκριτικά με εκείνα που είχαν υποστεί ρύθμιση με γαλακτικό οξύ. Η ανάπτυξη λοιπόν του μικροοργανισμού στο γαλακτικό οξύ φαίνεται να πραγματοποιείται σε κατώτερη τιμή pH και a_w 5.22 και 0.960 αντίστοιχα, ενώ φθάνει μέγιστη τιμή pH και ελάχιστη τιμή a_w 6.03 και 0.952 αντίστοιχα. Στην περίπτωση χρήσης οξικού οξέος ως μέσου ρύθμισης του pH του υποστρώματος, η κατώτερη τιμή pH και ενεργότητας νερού που απαιτείται προκειμένου να υπάρξει ανάπτυξη του μικροοργανισμού είναι 5.41 και 0.960 αντίστοιχα, ενώ σε τιμες pH 5.80 και 6.03 η ανάπτυξη σταματά σε κατώτερη τιμή a_w 0.952, όπως και στην περίπτωση του γαλακτικού οξέος.



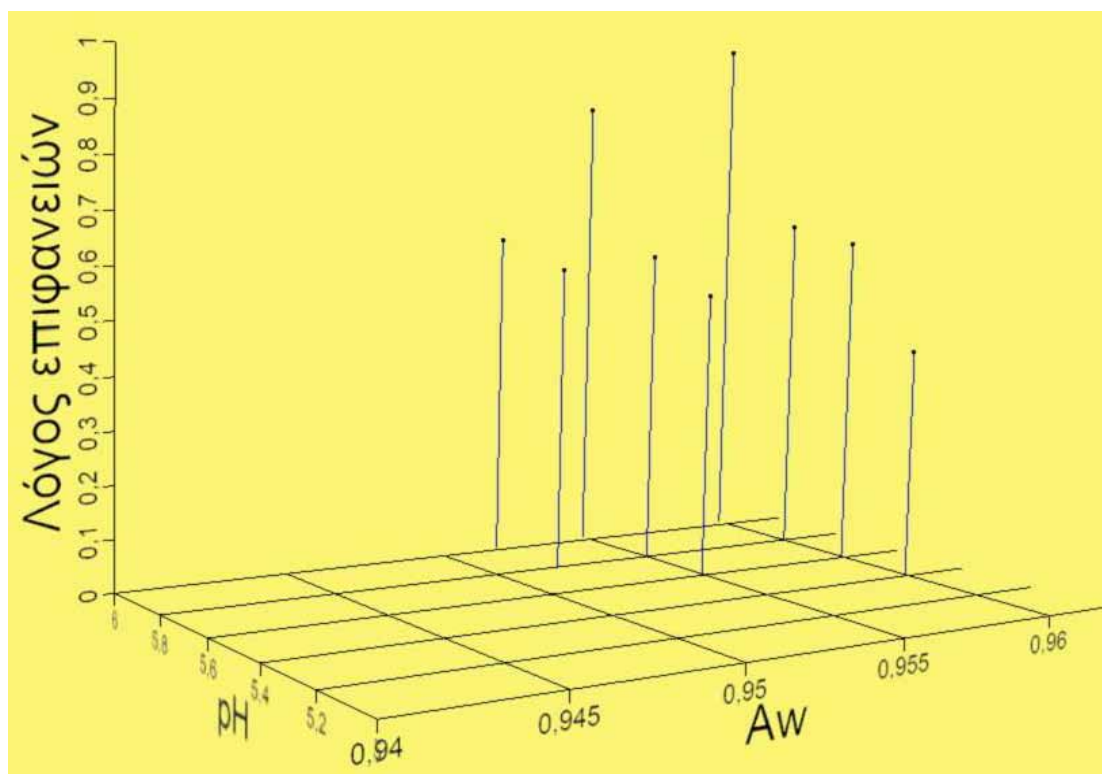
Σχήμα 34. Γραφική απεικόνιση ανάπτυξης-μη ανάπτυξης του βακτηρίου *Yersinia enterocolitica* CITY 650 σε υποστρώματα με διαβάθμιση του pH και της a_w (πείραμα στενότερων ορίων ανάπτυξης).

Κόκκινα σημεία = δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη στο συγκεκριμένο συνδυασμό pH - a_w
 Πράσινα σημεία = παρατηρήθηκε ανάπτυξη στο συγκεκριμένο συνδυασμό pH - a_w

Από τα τρισδιάστατα γραφήματα των σχημάτων 35 και 36 (γαλακτικό και οξικό οξύ αντίστοιχα) τεκμαίρεται για μια ακόμη φορά ότι όσο αυξάνονται οι τιμές pH και a_w τόσο αυξάνεται και ο λόγος των επιφανειών, πράγμα που υποδηλώνει μετάβαση προς ευνοϊκότερες συνθήκες ανάπτυξης (συνθήκες που προσεγγίζουν τη βέλτιστη). Η μέγιστη τιμή του λόγου των επιφανειών, ίση με 1, εντοπίζεται στο ζεύγος pH- a_w : 6.03-0.960 ενώ οι μικρότερες τιμές του όσον αφορά στο γαλακτικό οξύ, εντοπίζονται στα ζεύγη τιμών pH- a_w : 5.22-0.960, 5.43-0.955 και είναι ίσες με 0.40. Αντίστοιχα στο οξικό οξύ εντοπίζονται στο ζεύγος pH- a_w : 5.41-0.960 και 5.61-0.955 και είναι ίσες με 0.44 και 0.54 αντίστοιχα. Οι λόγοι των επιφανειών και στα δύο οργανικά οξέα κυμαίνονται στα ίδια περίπου επίπεδα κοντά στο 0.5 αποκλίνοντας από τη μέγιστη τιμή (βέλτιστη ανάπτυξη), κάτι το οποίο σε συνδυασμό και με τις υψηλές κατώτερες τιμές a_w (≥ 0.952) που απαιτούνται προκειμένου να αναπτυχθεί ο μικροοργανισμός, καθιστά το στέλεχος *Yersinia enterocolitica* CITY 650, το πιο ευαίσθητο και λιγότερο ανθεκτικό σε συνθήκες χαμηλής ενεργότητας νερού (συγκεντρώσεις NaCl >6% w/v) εκ των τεσσάρων μελετώμενων στελεχών της παρούσας εργασίας.



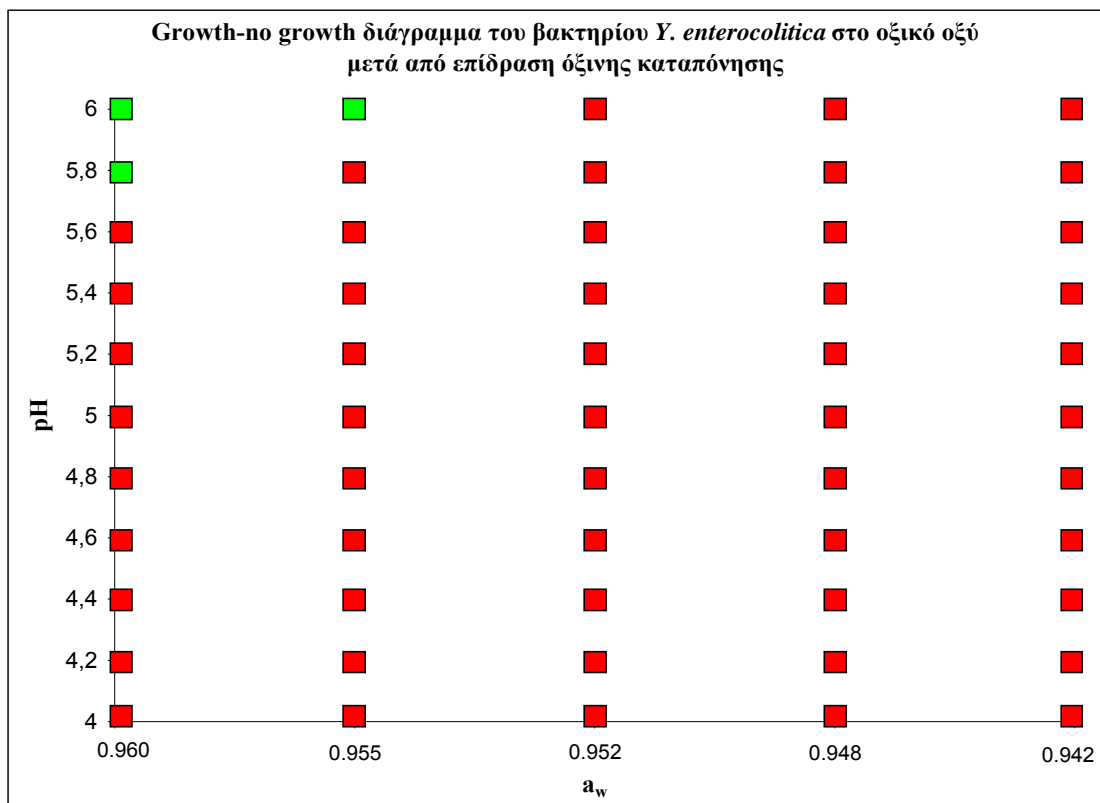
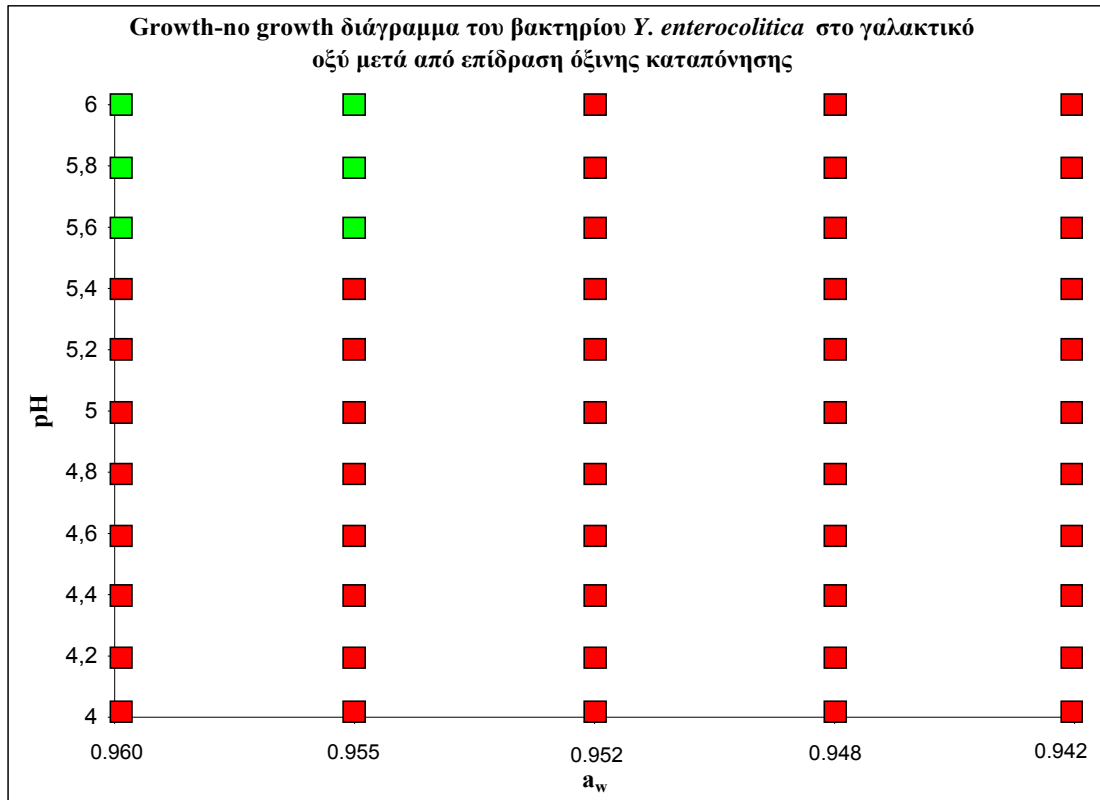
Σχήμα 35. Τρισδιάστατο συγκριτικό γράφημα τριών μεταβλητών (pH, a_w , λόγος επιφανειών). Απεικονίζεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Yersinia enterocolitica* CITY 650 σε υποστρώματα των οποίων το pH έχει ρυθμιστεί με χρήση γαλακτικού οξέος.



Σχήμα 36. Τρισδιάστατο συγκριτικό γράφημα τριών μεταβλητών (pH, a_w , λόγος επιφανειών). Απεικονίζεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Yersinia enterocolitica* CITY 650 σε υποστρώματα των οποίων το pH έχει ρυθμιστεί με χρήση οξικού οξέος.

3.4.2. Ανάπτυξη του στελέχους *Yersinia enterocolitica* CITY 650 κατόπιν προσαρμογής σε συνθήκες όξινης καταπόνησης – Σύγκριση με συνθήκες μη προσαρμογής

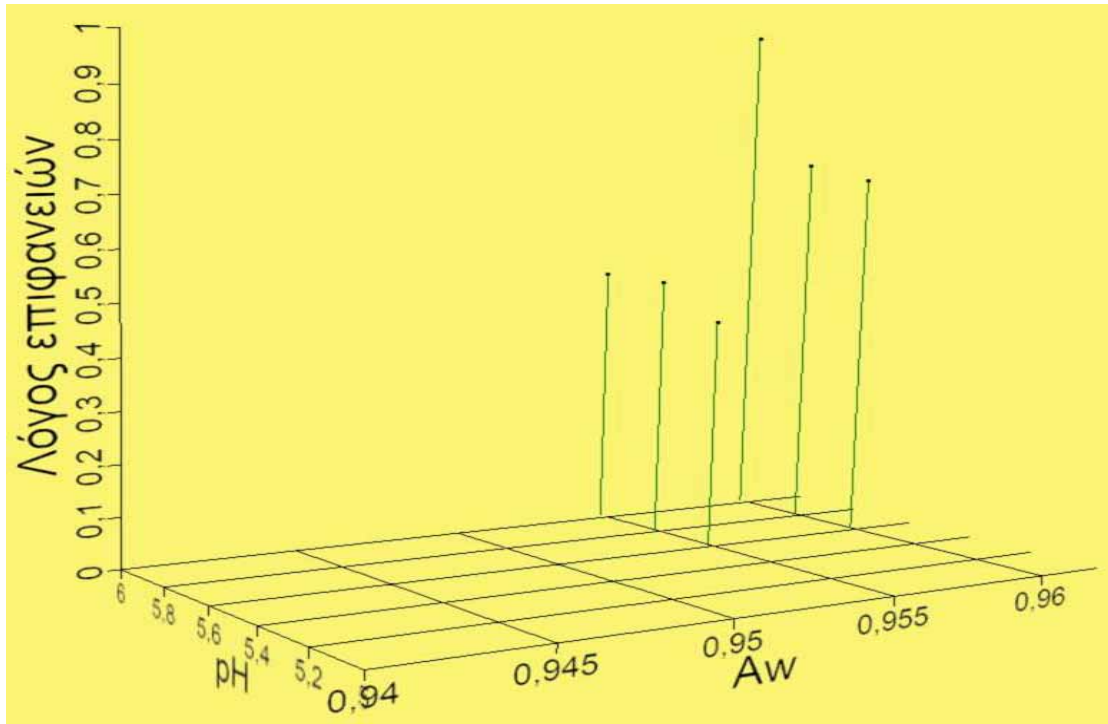
Στην προηγούμενη παράγραφο περιγράφηκε η ανάπτυξη του στελέχους *Yersinia enterocolitica* CITY 650 σε υποστρώματα με διαβάθμιση του pH και της ενεργότητας νερού χωρίς να έχει προηγηθεί προσαρμογή του σε συνθήκες όξινης καταπόνησης. Κατόπιν όμως προσαρμογής του μικροοργανισμού σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (TSBYE pH 5.0) τα όρια ανάπτυξής του διαμορφώνονται σύμφωνα με τα Σχήματα 37, 38 και 39 που ακολουθούν. Από την παρατήρηση των σχημάτων εύκολα εξάγεται το συμπέρασμα ότι η έκθεση του μικροοργανισμού *Y. enterocolitica* σε συνθήκες όξινης καταπόνησης, είχε ως αποτέλεσμα τη μη ικανότητα ανάπτυξής της σε κάποιους από τους συνδυασμούς pH- a_w , που αρχικά (όταν δεν είχε υποστεί όξινη καταπόνηση) είχε αναπτυχθεί (Σχήμα 34). Παρατηρούμε ότι η ανάπτυξη στα υποστρώματα των οποίων το pH είχε ρυθμιστεί με χρήση γαλακτικού οξέος, ξεκινά πλέον από κατώτερη τιμή pH 5.62 και ελάχιστη ενεργότητα νερού 0.955 (έναντι 5.22 και 0.960 αντίστοιχα στην περίπτωση της μη προσαρμογής), ενώ σε τιμές pH από 5.82 έως και 6.03



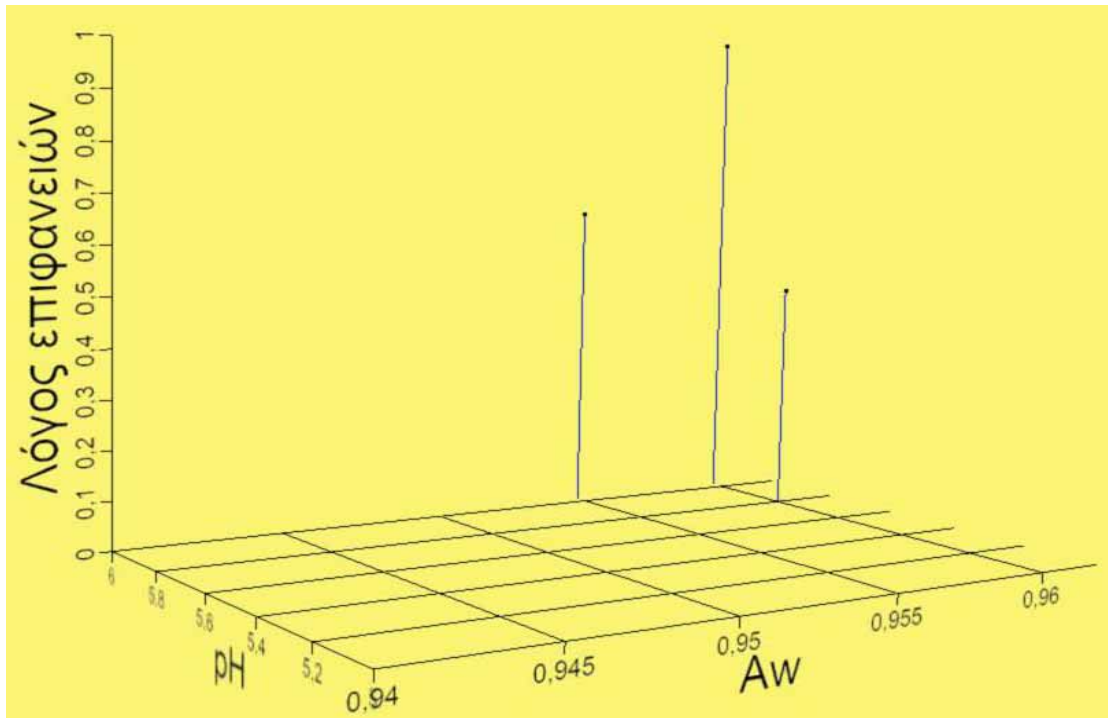
Σχήμα 37. Γραφική απεικόνιση ανάπτυξης-μη ανάπτυξης του βακτηρίου *Yersinia enterocolitica* CITY 650 σε υποστρώματα με διαβάθμιση του pH και της a_w κατόπιν επίδρασης όξινης καταπόνησης.
 Κόκκινα σημεία = δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη στο συγκεκριμένο συνδυασμό pH - a_w
 Πράσινα σημεία = παρατηρήθηκε ανάπτυξη στο συγκεκριμένο συνδυασμό pH - a_w

ο μικροοργανισμός δεν φαίνεται να είναι ικανός να αναπτυχθεί σε ενεργότητα νερού χαμηλότερη από 0.955 (έναντι 0.952 στις συνθήκες μη προσαρμογής). Το εύρος ανάπτυξης του βακτηρίου *Y. enterocolitica* στο οξικό οξύ, φαίνεται να είναι για μια ακόμη φορά μειωμένο ακόμα περισσότερο σε σχέση με το γαλακτικό, με το ζεύγος pH-a_w : 5.80-0.960 να αποτελεί το συνδυασμό από τον οποίο ξεκινά η ανάπτυξη (έναντι 5.41-0.960 στις συνθήκες μη προσαρμογής), ενώ σε pH 6.03 να μην καθίσταται δυνατή κάτω από ενεργότητα νερού 0.955 (έναντι 0.952 στη μη προσαρμογή). Είναι προφανές ότι το στέλεχος *Yersinia enterocolitica* CITY 650 κατόπιν προσαρμογής του στις συνθήκες όξινης καταπόνησης όχι μόνο δεν κατορθώνει να ενισχύσει την οξεοανθεκτικότητά του, με αποτέλεσμα οι ελάχιστες τιμές pH που απαιτούνται πλέον για την ανάπτυξή του να είναι υψηλότερες συγκριτικά με τις συνθήκες μη προσαρμογής, ενώ δεν φαίνεται να ενισχύεται και η ωσμωανθεκτικότητά του – όπως στην περίπτωση του στελέχους *L. monocytogenes* LQC 15015 (βλ. παρ. 3.2.2.) – η οποία θα συνέβαλλε στην επιβίωση του στελέχους σε χαμηλές τιμές ενεργότητας νερού. Έτσι μετά την προσαρμογή η ανάπτυξη καθίσταται δυνατή μόνο σε υψηλότερες τιμές a_w συγκριτικά με την περίπτωση της μη προσαρμογής.

Στα τρισδιάστατα γραφήματα των σχημάτων 38 και 39 παρατηρούμε ότι στο μεν γαλακτικό οξύ, η μέγιστη τιμή του λόγου των επιφανειών, ίση με 1, εντοπίζεται στο ζεύγος τιμών pH-a_w : 6.03-0.960 και η μικρότερη 0.45 στο ζεύγος 5.62-0.955. Αντίστοιχα στο οξικό οξύ η μέγιστη τιμή παρατηρείται επίσης στο ζεύγος pH-a_w : 6.03-0.960 και η μικρότερη 0.47 στο ζεύγος τιμών 5.80-0.960. Συγκριτικά με τις συνθήκες μη προσαρμογής, ο μικροοργανισμός *Y. enterocolitica* κατόπιν προσαρμογής του σε συνθήκες ήπια όξινης καταπόνησης (pH 5.0), παρουσίασε μειωμένο εύρος και ικανότητα ανάπτυξης σε χαμηλές τιμές pH και ενεργότητας νερού, ενώ ούτε οι λόγοι των επιφανειών δεν κυμάνθηκαν σε υψηλά επίπεδα, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η ανάπτυξη στους διάφορους συνδυασμούς pH-a_w απέχει από το συνδυασμό βέλτιστης ανάπτυξης 6.03-0.960, με μέγιστη τιμή 1. Συμπερασματικά από όλα όσα αναφέρθηκαν ανωτέρω, το στέλεχος *Yersinia enterocolitica* CITY 650 επέδειξε τη μικρότερη οξεοανθεκτικότητα και ωσμωανθεκτικότητα – κυρίως κατόπιν έκθεσης του σε συνθήκες όξινης καταπόνησης – μεταξύ των τεσσάρων στελεχών που μελετήθηκαν.



Σχήμα 38. Τρισδιάστατο συγκριτικό γράφημα τριών μεταβλητών (pH, a_w , λόγος επιφανειών). Απεικονίζεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Yersinia enterocolitica* CITY 650 - μετά την επίδραση όξινης καταπόνησης - σε υποστρώματα των οποίων το pH έχει ρυθμιστεί με χρήση γαλακτικού οξέος.



Σχήμα 39. Τρισδιάστατο συγκριτικό γράφημα τριών μεταβλητών (pH, a_w , λόγος επιφανειών). Απεικονίζεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Yersinia enterocolitica* CITY 650 - μετά την επίδραση όξινης καταπόνησης - σε υποστρώματα των οποίων το pH έχει ρυθμιστεί με χρήση οξικού οξέος.

3.4.3. Συζήτηση

Παρά το γεγονός ότι ο μικροοργανισμός *Yersinia enterocolitica* έχει καταδειχθεί ως ένα οξεοανθεκτικό τροφιμογενές παθογόνο που μπορεί να αναπτυχθεί ακόμα και σε pH 4.4 (ρύθμιση pH με χρήση HCl), υπάρχουν μελέτες σχετικές με την ανάπτυξη και την επιβίωση αυτού του βακτηρίου σε όξινα υποστρώματα και τρόφιμα, αντίθετες με αυτή την άποψη (Brackett, 1986, 1987· Hanna et al., 1977· Kendall και Gilbert, 1980· Restaino et al., 1981· Stern et al., 1980). Εντούτοις, οι EI-Ziney et al. (1995) έδειξαν ότι το στέλεχος *Y. enterocolitica* IP 383 (O:9) μπορούσε να αναπτυχθεί αερόβια ή αναερόβια σε pH 4.2 στους 4°C και να επιζήσει για 21 ημέρες σε pH 3.9 υπό τις ίδιες συνθήκες, ενώ τα αναπτυσσόμενα ή επιβιώσαντα κύτταρα δεν έχασαν το πλασμίδιο λοιμοτοξικότητας (virulence plasmid).

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενες παραγράφους οργανικά οξέα όπως το φορμικό, γαλακτικό και προπιονικό οξύ, των οποίων η παρουσία στα τρόφιμα είναι είτε φυσική (συσσώρευση τους ως αποτέλεσμα της ζύμωσης που πραγματοποιείται από γαλακτικά ή προπιονικά βακτήρια), είτε προκύπτει από τη σκόπιμη προσθήκη τους στα τρόφιμα κατά την παρασκευή τους, χρησιμοποιούνται για πάρα πολλά χρόνια ως συντηρητικά. Δεδομένου ότι τα ανασταλτικά αποτελέσματα αυτών των οξέων σχετίζονται κυρίως με το ποσοστό του οξέος σε αδιάστατη μορφή (Baird-Parker, 1980· Adams και Hall, 1988· Debevere, 1988), η αποτελεσματικότητά τους εξαρτάται από τη σταθερά διάστασης (pK_a) του οξέος. Τα οξέα μπορούν να ασκήσουν την ανασταλτική δραστηριότητά τους με τη μείωση του pH του κυτταροπλάσματος και την απορρύθμιση της ροής πρωτονίων, ή με την επίδρασή τους στις μεταβολικές δραστηριότητες του κυττάρου (Freese et al., 1973· Cherrington et al., 1990· Ricke, 2003). Διάφορες συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με άλλες χημικές ουσίες, έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικές στην εξουδετέρωση παθογόνων βακτηρίων όπως είναι τα *E. coli* και *L. monocytogenes* (Akbas και Olmez, 2007), ενώ σε συγκεντρώσεις μεταξύ 0.3% και 4% v/v και σε οποιαδήποτε θερμοκρασία (4°, 20° και 40°C) το γαλακτικό οξύ έχει αποδειχθεί πιο αποτελεσματικό στην in vitro μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου *Y. enterocolitica* συγκρινόμενο με το κιτρικό οξύ (συγκεντρώσεις 1% έως 20% w/v) (Virto et al., 2005). Στη μελέτη των Velazquez et al. (2009) η πιο αποτελεσματική εκ των μεθόδων εξυγίανσης τοματών που μελετήθηκαν, ήταν η χρήση γαλακτικού οξέος 0.2%, αφού οδήγησε σε μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου *Y. enterocolitica* κατά 5.08 λογαριθμικούς κύκλους.

Οι Karapinar και Gonul (1992) εξέτασαν την επίδραση που είχαν διάφοροι παράγοντες στην ανάπτυξη και επιβίωση του μικροοργανισμού *Y. enterocolitica* σε θρεπτικό μέσο και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι με τη χρήση οξικού οξέος συγκέντρωσης 0.156% και αντίστοιχη τιμή pH 5.58, η ανάπτυξη του μικροοργανισμού υφίστατο ολική παρεμπόδιση σε οποιαδήποτε συγκέντρωση αρχικού εμβολίου και τα κύτταρα πέθαιναν. Αυτή η παρατήρηση είναι κοντά στα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την παρούσα μελέτη όπου η ανάπτυξη του στελέχους *Y. enterocolitica* CITY 650 σε υποστρώματα των οποίων το pH είχε ρυθμιστεί με χρήση οξικού οξέος, περιορίστηκε σε κατώτερη τιμή pH 5.41 και ενεργότητα νερού 0.960. Επίσης από τη μελέτη των Karapinar και Gonul (1992) φάνηκε κι η μειωμένη αντιβακτηριακή ικανότητα του κιτρικού οξέος συγκριτικά με το οξικό στις ίδιες συγκεντρώσεις, παρά το γεγονός ότι το pH των υποστρωμάτων που είχαν υποστεί ρύθμιση με κιτρικό κατερχόταν χαμηλότερα από εκείνων που είχαν ρυθμιστεί με οξικό. Οι EI-Ziney et al. (1997) θέλοντας να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την επίδραση διαφόρων οργανικών οξέων μικρής αλύσσου στην ανάπτυξη του βακτηρίου *Y. enterocolitica* στους 4°C υπό αναερόβιες και μη αναερόβιες συνθήκες, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι σε τιμές pH 5.8 και 5.4 η σειρά της παρεμπόδισης ήταν η: φορμικό οξύ > οξικό οξύ > προπιονικό οξύ > γαλακτικό οξύ, ενώ σε τιμές pH κάτω από 5 αυτή μετατρέπεται σε φορμικό οξύ > γαλακτικό οξύ > οξικό οξύ > προπιονικό οξύ. Στις μελέτες των Adams et al., (1991) και Little et al., (1992) το οξικό εμφανίστηκε ως το πιο παρεμποδιστικό της ανάπτυξης οργανικό οξύ, συγκρινόμενο με το γαλακτικό, κιτρικό και θειικό οξύ. Στην παρούσα εργασία χωρίς αμφιβολία το οξικό οξύ ήταν το πιο περιοριστικό της ανάπτυξης – είτε σε συνθήκες προσαρμογής, είτε μη προσαρμογής – του στελέχους *Y. enterocolitica* CITY 650, εκ των δύο οργανικών οξέων που χρησιμοποιήθηκαν για τη ρύθμιση του pH του υποστρώματος.

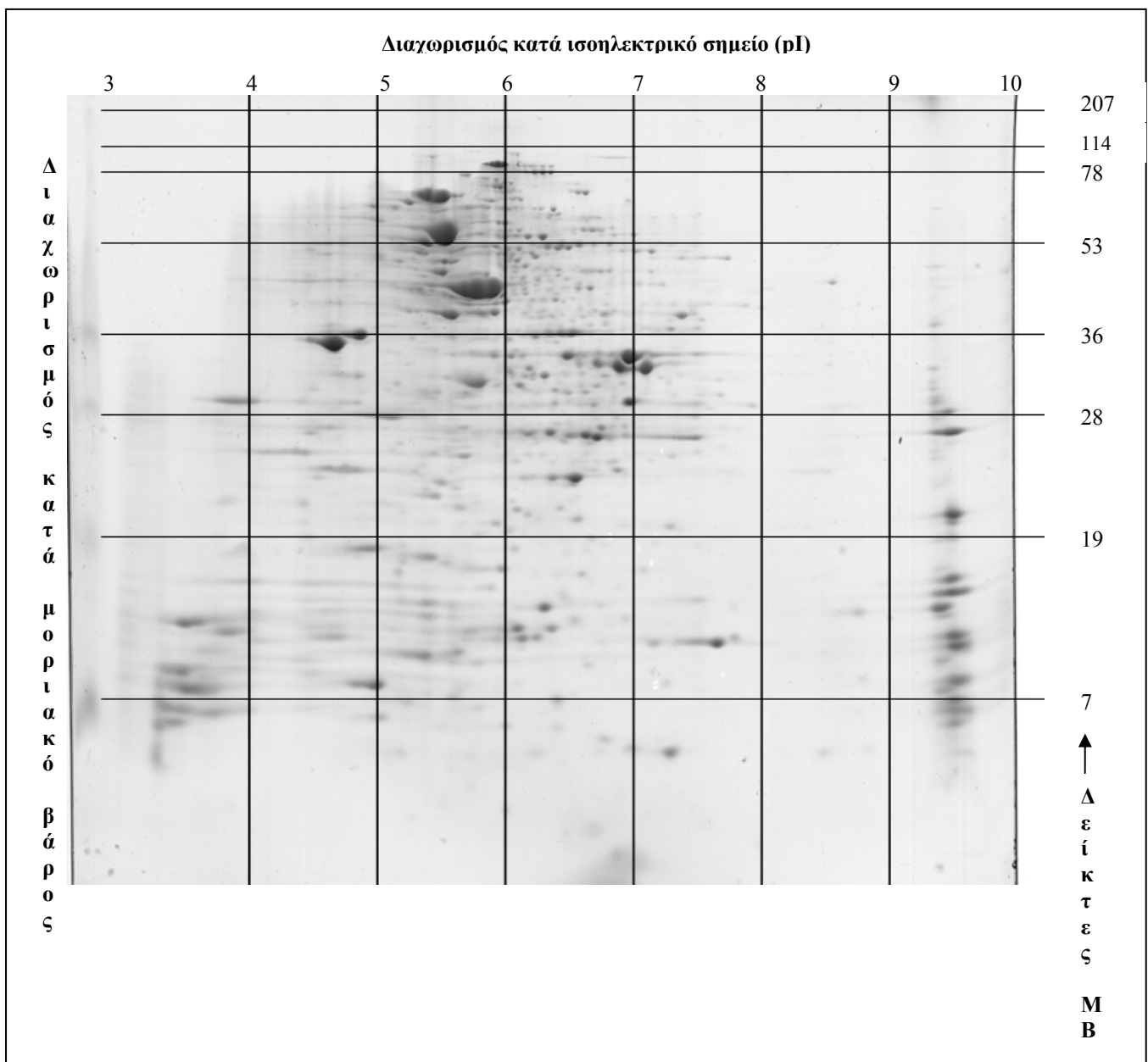
Όπως έχει ήδη αναφερθεί και σε προηγούμενες παραγράφους, τα παθογόνα βακτήρια μπορούν να υπερνικήσουν το περιβαλλοντικό στρές που τους προκαλείται, με την επαγωγή συγκεκριμένων μηχανισμών προσαρμογής (Neidhardt, 1987) οι οποίοι μπορούν να τα βοηθήσουν να επιβιώσουν υπό δυσμενείς συνθήκες. Όπως έχει φανεί και στην παρούσα μελέτη η προσαρμογή σε ένα δεδομένο περιβαλλοντικό εμπόδιο (θερμοκρασία, pH, a_w κ.α.) μπορεί να αυξήσει, σε κάποιο βαθμό, την ανθεκτικότητα και πρὸς άλλους επίσης στρεσογόνους παράγοντες του περιβάλλοντος (Leyer και Johnson, 1993). Έτσι κατά την επώαση σε θαλασσινό νερό ορισμένων

ειδών εντεροβακτηρίων για μια χρονική περίοδο 100 min., τα κύτταρα *E. coli* και *Shigella* επέδειξαν ισχυρή ανθεκτικότητα στις μετέπειτα συνθήκες όξινης καταπόνησης στις οποίες υπεβλήθησαν (περιβάλλον προσομοίωσης στομάχου με pH 2.5 για 2h) (Gauthier και Clement, 1994). Η ανθεκτικότητα αυτή ήταν εμφανής στα είδη *E.coli* και *Shigella*, ενώ απουσίασε από τα είδη *Salmonella typhi*, *S. paratyphi*, *S. enterica*, *Klebsiella pneumoniae* και *Yersinia enterocolitica* τα οποία χαρακτηρίζονται από μια υψηλότερη εν γένει ευαισθησία σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (Gorden και Small, 1993). Αυτός πιθανότατα είναι και ο λόγος που στην παρούσα μελέτη το στέλεχος *Yersinia enterocolitica* CITY 650 παρουσίασε μειωμένη ανθεκτικότητα σε χαμηλές τιμές pH και a_w , συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη εντεροβακτηρίων και το μικροοργανισμό *L. monocytogenes*. Οι Lindqvist και Lindblad (2009) στα πειράματα που πραγματοποίησαν με ανάπτυξη του προσαρμοσμένου (με χρήση TSB+1% γλυκόζη) σε συνθήκες όξινης καταπόνησης βακτηρίου *Y. enterocolitica*, αφενός σε BHI broth (pH 4.4 ρυθμισμένο με γαλακτικό οξύ 2% και a_w 0.93-0.94) και αφετέρου σε ζυμούμενα αλλαντικά, σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες 8° και 22°C, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο πληθυσμός του μικροοργανισμού παρουσίαζε ταχύτερη μείωση σε θερμοκρασία 22°C συγκριτικά με τους 8°, καταδεικνύοντας έτσι το ρόλο που μπορεί να παίζει η θερμοκρασία στην αδρανοποίηση του μικροοργανισμού. Ενώ σε συνθήκες αποθήκευσης ζυμούμενων αλλαντικών, σε θερμοκρασία 8°C το βακτήριο *Y. enterocolitica* επέδειξε αργή μείωση του πληθυσμού του (1 log σε 18 ημέρες), σε θερμοκρασία 22°C σε BHI broth παρατηρήθηκε ταχύτατη μείωση του (1 log σε 1 ημέρα) εν συγκρίσει με τα υπόλοιπα δύο στελέχη που μελετήθηκαν (*E. coli* και *L. monocytogenes*) (Lindqvist και Lindblad, 2009). Αυτά τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με αντίστοιχες παρατηρήσεις επιβίωσης του βακτηρίου *Y. enterocolitica* σε ζυμούμενα αλλαντικά που παρασκευάζονται με προσθήκη καλλιεργείων εκκίνησης και μέχρι 50 mg/kg νιτρικού νατρίου (Asplund et al., 1993) αλλά και σε ζυμούμενα αλλαντικά (Suçuk) χωρίς καλλιέργειες εκκίνησης και pH 5.6, όπου το βακτήριο *Y. enterocolitica* επιβίωνε μετά από ζύμωση 4 ημερών και ξήρανση 12 ημερών (Ceylan και Fung, 2000). Αντίθετα, στο ίδιο προϊόν ο πληθυσμός του βακτηρίου δεν ανιχνευόταν μετά από 3 ημέρες εάν γινόταν χρήση καλλιεργείων εκκίνησης (Ceylan και Fung, 2000), γεγονός που δείχνει τη συμβολή των οξυγαλακτικών βακτηρίων – ως καλλιεργείων εκκίνησης – και των προϊόντων που αυτά παράγουν (γαλακτικό οξύ, βακτηριοσίνες), στη διασφάλιση τροφίμων απαλλαγμένων από παθογόνους μικροοργανισμούς.

3.4.4. Επίδραση στο πρωτέωμα

Η επίδραση της προσαρμογής σε συνθήκες όξινης καταπόνησης επί του πρωτεώματος του στελέχους *Yersinia enterocolitica* CITY 650, αξιολογήθηκε όπως και στην περίπτωση των προηγούμενων στελεχών, με χρήση ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμιδίου δύο διαστάσεων (2D GE) σε συνδυασμό με το λογισμικό ηλεκτρονικού υπολογιστή PDQuest Advanced 8.0.1 (BIO-RAD) και τη βοήθεια σαρωτή-μετρητή οπτικής πυκνότητας πηκτών πολυακρυλαμιδίου (GS 800 Calibrated Densitometer, BIO-RAD).

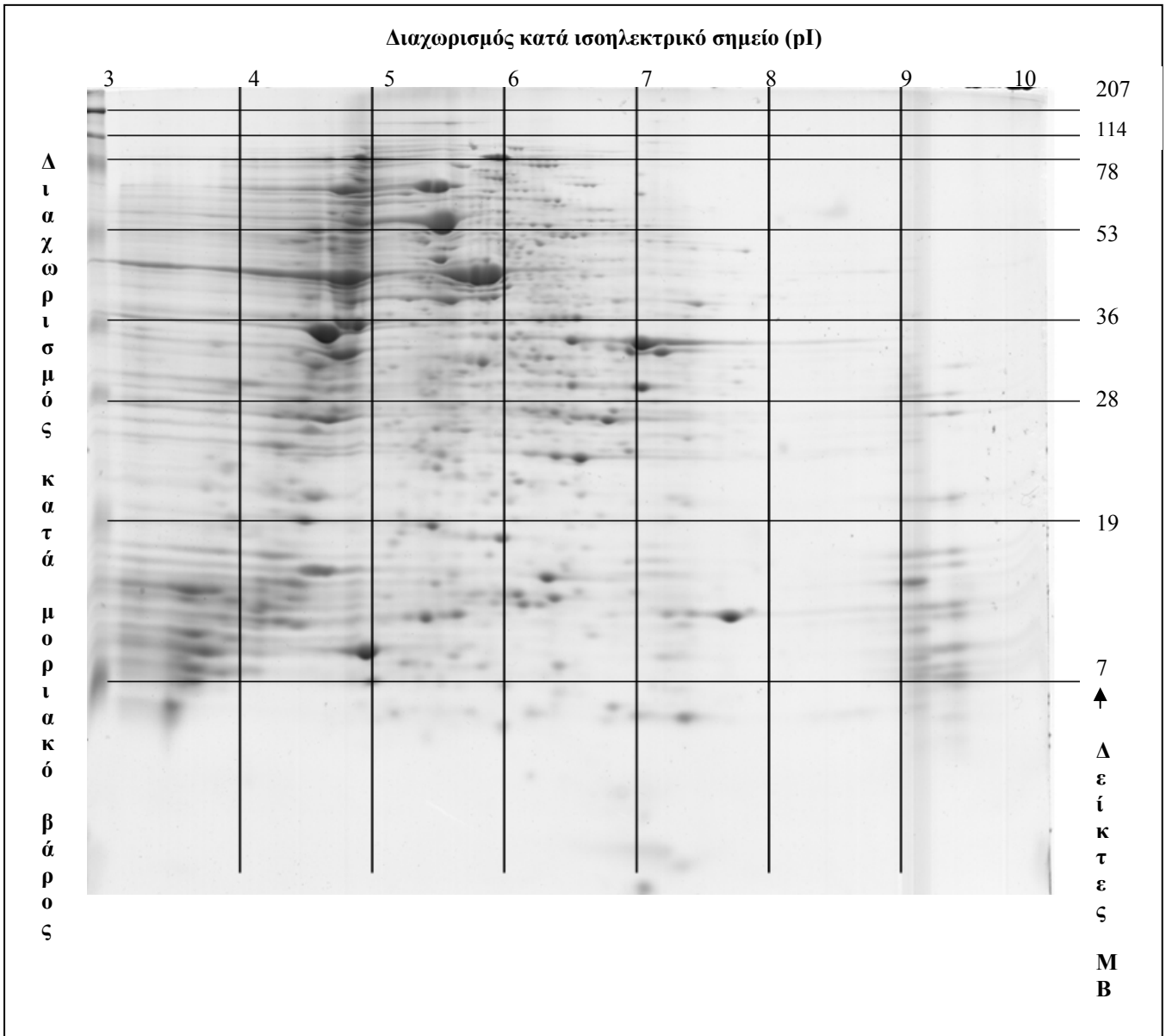
3.4.4.1. Πρωτεϊνική κατατομή σε συνθήκες μη προσαρμογής



Σχήμα 40. Επίδραση συνθηκών μη προσαρμογής (pH 7.0) στο πρωτέωμα του βακτηρίου *Yersinia enterocolitica* CITY 650 μετά από ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου δύο διαστάσεων.

Στο Σχήμα 40 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της 2D GE ηλεκτροφόρησης των εν μέσω λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης, κυττάρων του στελέχους *Yersinia enterocolitica* CITY 650, χωρίς προηγουμένως να έχουν υποστεί προσαρμογή σε συνθήκες ήπια όξινης καταπόνησης.

3.4.4.2. Πρωτεϊνική κατατομή σε συνθήκες όξινης προσαρμογής

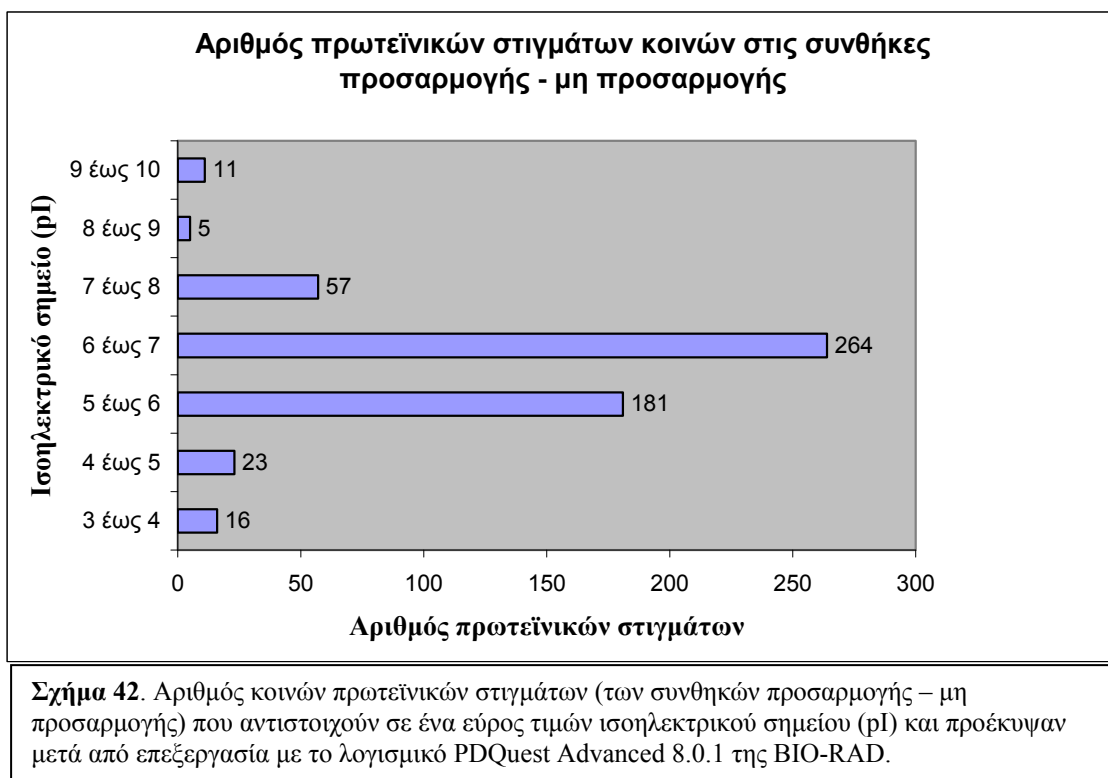


Σχήμα 41. Επίδραση συνθηκών όξινης προσαρμογής (pH 5.0) στο πρωτέωμα του βακτηρίου *Yersinia enterocolitica* CITY 650 μετά από ηλεκτροφόρηση πηκτικής πολυακρυλαμιδίου δύο διαστάσεων.

Μετά την προσαρμογή του στελέχους *Yersinia enterocolitica* CITY 650 σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (pH 5.0), η πρωτεϊνική κατατομή (πρωτέωμα) του βακτηρίου παρουσιάζει την εικόνα του Σχήματος 41.

3.3.4.3. Σύγκριση μεταξύ συνθηκών προσαρμογής και μη προσαρμογής και ταυτοποίηση πρωτεϊνών

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων που λαμβάνουμε από τις ηλεκτροφορήσεις πραγματοποιείται όπως προαναφέρθηκε, με σάρωση και ταυτόχρονη επεξεργασία των αποτυπωμένων επί των πηκτών της ηλεκτροφόρησης πρωτεωμάτων, με το λογισμικό ηλεκτρονικού υπολογιστή PDQuest Advanced 8.0.1 της BIO-RAD. Ο εντοπισμός ομοιοτήτων ή διαφορών έγκειται στην εύρεση πρωτεϊνικών στιγμάτων κοινά απαντώμενων τόσο σε συνθήκες προσαρμογής όσο και μη προσαρμογής, αλλά και στην εύρεση μοναδικών πρωτεϊνικών στιγμάτων που εμφανίζονται μόνο σε μια εκ των δύο περιπτώσεων. Τα κοινά πρωτεϊνικά στίγματα που εμφανίστηκαν στις περιπτώσεις προσαρμογής και μη προσαρμογής παρουσιάζονται στο ραβδόγραμμα του Σχήματος 42.



Αναλυτική παρουσίαση θα ακολουθήσει μόνο για εκείνα τα στίγματα και τις αντιστοιχούσες σ'αυτά πρωτεΐνες, που εμφανίστηκαν στην περίπτωση μη προσαρμογής (pH 7.0) (Πίνακας 21), αφού πέραν των κοινών πρωτεϊνικών στιγμάτων μεταξύ των συνθηκών προσαρμογής – μη προσαρμογής (Σχήμα 42), δεν ανιχνεύθηκαν επαγόμενες πρωτεΐνες μοναδικές για την περίπτωση προσαρμογής σε συνθήκες ήπια όξινης καταπόνησης (pH 5.0), με μοναδική εξαίρεση μια πρωτεΐνη

θερμικής κατάπληξης 71 kDa με ισοηλεκτρικό σημείο 4.84, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *dnaK* και λειτουργεί ως χαπερόνιο. Πιθανώς το βακτήριο έχοντας ως μέγιστη τιμή ανάπτυξης βάσει της βιβλιογραφίας τους 40°C, να βρέθηκε σε κατάσταση θερμοκρασιακής καταπόνησης κατά την ανάπτυξή του στους 37°C – που είναι εξάλλου η θερμοκρασία επώασης στην παρούσα μελέτη – με αποτέλεσμα την επαγωγή της συγκεκριμένης πρωτεΐνης θερμικής κατάπληξης η οποία εμπλέκεται στη διατήρηση της ομοιόστασης του βακτηριακού κυττάρου. Όπως στην περίπτωση του στελέχους *S. enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 (παρ. 3.3.4.3.), έτσι και με το παρόν στέλεχος *Yersinia enterocolitica* CITY 650, αυτή η έλλειψη σύνθεσης πρωτεϊνών που παρατηρήθηκε και συγκεκριμένα πρωτεϊνών όξινης κατάπληξης ή όξινου εγκλιματισμού (Acid Shock Proteins - ASPs) όπως αποκαλούνται, των οποίων ο ρόλος είναι κυρίως η προστασία ή/και επισκευή διαφόρων κυτταρικών μακρομορίων κατόπιν επίδρασης χαμηλών τιμών pH (Bearson et al., 1997), ήταν πιθανότατα και η αιτία του πολύ μειωμένου εύρους ανάπτυξης συγκριτικά με τις συνθήκες μη προσαρμογής (βλ. Σχήματα 34 και 37).

Κάθε ένα από τα εμφανισθέντα πρωτεϊνικά στίγματα επί της πηκτής της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων, αντιστοιχεί σε μια ή περισσότερες πρωτεΐνες, με γνωστά στοιχεία το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) και το μοριακό βάρος (σε kDa) – οριζόντιος και κάθετος άξονας αντίστοιχα των σχημάτων 40 και 41 – του κάθε στίγματος. Ο ποιοτικός προσδιορισμός των στιγμάτων που προέκυψαν, πραγματοποιήθηκε για μια ακόμη φορά με αναζήτηση των αντιστοιχουσών πρωτεϊνών στην ηλεκτρονική βάση δεδομένων EXPASY (<http://ca.expasy.org/tools/tagident.html>). Τα αποτελέσματα της αναζήτησης φαίνονται στον Πίνακα 21.

Πίνακας 21. Αποτελέσματα αναζήτησης στη βάση δεδομένων EXPASY για τον ποιοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών προερχόμενων από πρωτεϊνικά στίγματα, κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου *Yersinia enterocolitica* CITY 650 σε συνθήκες μη προσαρμογής (pH 7.0).

Κωδικός στίγματος	Στοιχεία στίγματος		Πιθανές πρωτεΐνες	Γονίδιο
	Μοριακό βάρος (kDa)	Ισοηλεκτρικό σημείο (pI)		
1216	15.22	4.65	Πρωτεΐνη YmoB Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	ymoB -
3205	15.43	5.42	Θεωρούμενη νουκλεάση ανασυνδυασμού	-

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

			και επισκευής DNA Θεωρούμενη πρωτεΐνη προστασίας από υπ ακτινοβολία και μετάλλαξη	umuD
3211	16.10	5.64	Θεωρούμενη πρωτεΐνη μεμβράνης	-
4104	14.21	6.01	Πρωτεΐνη X μεταφοράς πρωτεϊνών Yop κωδικοποιούμενη στο πλασμίδιο pYV	yscX
4106	13.34	6.15	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	-
4107	14.79	6.19	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη Θεωρούμενη ακετυλοτρανσφεράση	- -
6101	14.39	6.70	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη Θεωρούμενη πρωτεΐνη μεμβράνης	- yijD
6421	35.07	7.01	Θεωρούμενη πρωτεΐνη μεμβράνης Καταβολική αφυδρατάση της θρεονίνης	- tdcB
7608	69.18	7.34	DNA ελικάση εξαρτώμενη από το ATP (επιδιόρθωση και ανασυνδυασμός κατεστραμμένου DNA)	recQ
7415	30.45	7.62	Θεωρούμενος μεταφορέας 1 φορμικού οξέος Αφυδρογονάση του σορβιτολο- 6 - φωσφορικού οξέος	focA gutD
7518	51.26	7.62	RNA ελικάση εξαρτώμενη από το ATP	dbpA
7205	16.87	7.63	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	-
7423	30.18	8.07	Θεωρούμενη πρωτεΐνη μεμβράνης Γουανινο- N1- μεθυλοτρανσφεράση του rRNA	- rnmA
7319	24.18	8.62	Θεωρούμενη πρωτεΐνη μεμβράνης	-
7210	16.29	8.94	Θεωρούμενη πρωτεΐνη αντιτερματισμού μεταγραφής	-
8204	18.39	9.62	Θεωρούμενη λιποπρωτεΐνη Θεωρούμενη πρωτεΐνη αντιτερματισμού μεταγραφής	- -

Κατά την ανάπτυξη του στελέχους *Yersinia enterocolitica* CITY 650 σε συνθήκες μη προσαρμογής (pH 7.0) υπήρξε επαγωγή ενός αριθμού πρωτεϊνών (και ενζύμων), γεγονός το οποίο υποδηλώνει περαιτέρω εμπλοκή τους σε διάφορες μεταβολικές διεργασίες. Εξ' αυτών ξεχωρίζει η εξαρτώμενη από το ATP DNA ελικάση που είναι υπεύθυνη για την επιδιόρθωση και τον ανασυνδυασμό του κατεστραμμένου DNA και κωδικοποιείται από το γονίδιο recQ, η καταβολική αφυδρατάση της θρεονίνης

κωδικοποιούμενη από το γονίδιο *tdcB* και η πρωτεΐνη X μεταφοράς πρωτεϊνών Yop, κωδικοποιούμενη στο πλασμίδιο pYV από το γονίδιο *yscX*. Συγκεκριμένα η καταβολική αφυδρατάση της θρεονίνης, καταλύει την αντίδραση καταβολισμού (διάσπασης) της L-θρεονίνης προς 2-οξοβουτανοϊκό οξύ και αμμωνία (NH₃). Σύμφωνα με τους de Koning-Ward και Robins-Browne (1995), το ένζυμο της ουρεάσης καταλύει την υδρόλυση της ουρίας προς σχηματισμό διοξειδίου του άνθρακα και αμμωνίας, που οδηγεί σε αύξηση της τιμής του pH ενδοκυτταρικά και κατ'επέκταση επιβίωση σε χαμηλές τιμές pH του περιβάλλοντος. Πιθανότατα αυτό το ρόλο να επιτελεί και η αφυδρατάση της θρεονίνης η οποία παράγει ως τελικό προϊόν εκτός των άλλων και αμμωνία, η οποία δύναται να ρυθμίσει το ενδοκυτταρικό pH των κυττάρων του μικροοργανισμού *Y. enterocolitica*, αλλά το ένζυμο δεν φαίνεται να συντίθεται κατόπιν προσαρμογής σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (pH 5.0 για 1½ h στους 37°C), κάτι το οποίο φαίνεται προς στιγμήν να εξηγεί τη μειωμένη ανθεκτικότητα που παρουσιάζει ο μικροοργανισμός συγκριτικά με τις συνθήκες μη προσαρμογής (στις οποίες το ένζυμο κωδικοποιείται).

Κατά τη σύνδεση με τα κύτταρα του ξενιστή, τα παθογόνα στελέχη της *Yersinia* χρησιμοποιούν ένα σύστημα έκκρισης τύπου III (Type III Secretion System – TTSS) προκειμένου να μεταφέρουν τις πρωτεΐνες λοιμοτοξικότητας, Yops, στα κύτταρα του ξενιστή. Ο μικροοργανισμός *Yersinia* ρυθμίζει επακριβώς την έκφραση των γονιδίων που περιλαμβάνονται στο σύστημα έκκρισης τύπου III, στην παραγωγή και στη διακίνηση των Yop πρωτεϊνών. Στις *in vitro* καλλιέργειες, αυτή η ρυθμιστική απόκριση είναι γνωστή ως «απόκριση σε χαμηλή συγκέντρωση ασβεστίου» (Low Calcium Response – LCR) (Hueck, 1998), και καταστέλλεται σε θερμοκρασίες 26°C και 37°C παρουσία Ca⁺². Εντούτοις, στους 37°C ελλείπει Ca⁺², το σύστημα έκκρισης τύπου III είναι άκρως λειτουργικό και η σύνθεση πρωτεϊνών Yop επάγεται πλήρως. Με αυτή την περιγραφείσα ρυθμιστική απόκριση, συνδέεται άμεσα και η παρατήρηση ότι ο μικροοργανισμός *Yersinia* είναι ανίκανος να αναπτυχθεί κατά την παραγωγή πρωτεϊνών Yop (δηλ. σε θερμοκρασία 37°C σε υποστρώματα από τα οποία απουσιάζει το Ca⁺²) (Fällman και Gustavsson, 2005), κάτι το οποίο φαίνεται να εξηγεί την παρατηρηθείσα μειωμένη ανάπτυξη του στελέχους *Yersinia enterocolitica* CITY 650 στην παρούσα μελέτη. Επιπλέον οι πρωτεΐνες, SycH, LcrH/SycD, YscY, and YopD εμπλέκονται στην απόκριση LCR (Cambronne et al., 2000· Day και Plano, 2000· Francis et al., 2001· Iriarte και Cornelis, 1999), με την πρωτεΐνη YscY να ενώνεται και να αλληλεπιδρά με την YscX πρωτεΐνη του TTSS συστήματος.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο προηγούμενο κεφάλαιο, παρουσιάστηκε η επίδραση που είχε η προσαρμογή των τεσσάρων τροφιογενών παθογόνων βακτηρίων σε συνθήκες ήπια όξινης καταπόνησης, στην ανάπτυξή τους, στην επαγωγή ή μη της οξεοανθεκτικότητάς τους και στο πρωτέωμά τους. Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των τεσσάρων μικροοργανισμών διαδραμάτισε επίσης και το είδος του οργανικού οξέος που χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να γίνει ρύθμιση του pH του υποστρώματος, αφού σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις το οξικό οξύ ασκούσε μεγαλύτερο περιορισμό στην ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών, συγκριτικά με το γαλακτικό οξύ. Αυτό είναι δικαιολογημένο γιατί όπως είχε αναφερθεί και στην παράγραφο 3.3.3. εντός του εύρους pH (4 έως 7) της παρούσας μελέτης το ποσοστό του οξικού οξέος που παραμένει υπό αδιάστατη μορφή είναι πολύ μεγαλύτερο από εκείνο του γαλακτικού.

Όσον αφορά στο στέλεχος *E. coli* ATCC 25922, οι προσαρμοσμένες σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (pH 5.0) καλλιέργειές του, παρουσίασαν μειωμένη οξεοανθεκτικότητα και ωσμοανθεκτικότητα κατά την ανάπτυξή τους σε υποστρώματα με διαβάθμιση του pH και της ενεργότητας νερού, συγκριτικά με τις καλλιέργειες που δεν είχαν υποστεί προσαρμογή. Επιπλέον, κατόπιν ενοφθαλμισμού προσαρμοσμένων και μη καλλιεργειών του μικροοργανισμού, σε υποστρώματα των οποίων το pH είχε υποστεί ρύθμιση με χρήση γαλακτικού ή οξικού οξέος, φάνηκε το μειωμένο εύρος και ικανότητα ανάπτυξής τους – ανεξαρτήτως προσαρμογής – στο οξικό οξύ σε σχέση με το γαλακτικό. Σχετικά με την πρωτεϊνική κατατομή του στελέχους *E. coli* ATCC 25922 σε συνθήκες όξινης καταπόνησης, παρατηρείται η εμφάνιση μεταξύ άλλων και πολλών ενζύμων γεγονός που υποδηλώνει εμπλοκή τους σε περαιτέρω μεταβολικές διεργασίες και επαγωγή πρωτεϊνών, ενώ η ύπαρξη στο πρωτέωμα στοιχείων όπως η DNA ελικάση και το RNA χαπερόνιο Hfq, που σχετίζονται αντίστοιχα με την επιδιόρθωση του κατεστραμμένου DNA και τη ρύθμιση της μεταφραστικής διαδικασίας και απόκριση σε συνθήκες περιβαλλοντικής καταπόνησης, καταδεικνύουν την προσπάθεια εκ μέρους του μικροοργανισμού να προσαρμοστεί στο δυσμενές περιβάλλον στο οποίο εκτίθεται.

Το στέλεχος *Listeria monocytogenes* LQC 15015 ήταν το μοναδικό εκ των τεσσάρων μελετώμενων στελεχών του οποίου οι προσαρμοσμένες σε συνθήκες όξινης καταπόνησης καλλιέργειες, παρουσίασαν αυξημένη οξεοανθεκτικότητα αλλά

και ωσμοανθεκτικότητα κατά την ανάπτυξή τους στα διαβαθμισμένα από απόψεως pH και a_w υποστρώματα, συγκριτικά με τις μη προσαρμοσμένες καλλιέργειες. Αυτό γίνεται φανερό από τις αρκετά χαμηλότερες ελάχιστες τιμές pH και a_w που επιτρέπουν την ανάπτυξη των προσαρμοσμένων καλλιεργειών σε σχέση με τις μη προσαρμοσμένες. Ακόμα, οι μη προσαρμοσμένες καλλιέργειες του στελέχους *L. monocytogenes* LQC 15015 δείχνουν να αναπτύσσονται σε περισσότερους συνδυασμούς pH- a_w (μεγαλύτερο εύρος ανάπτυξης) στα υποστρώματα με οξικό οξύ απ'ότι σε αυτά με γαλακτικό, κάτι το οποίο διαφοροποιεί για μια ακόμη φορά το συγκεκριμένο στέλεχος από τα υπόλοιπα τρία. Αυτή η παρατήρηση όμως δεν φαίνεται να επιβεβαιώνεται και στις καλλιέργειες που έχουν υποστεί προσαρμογή, όπου συμβαίνει ακριβώς το αντίθετο. Σχετικά με το πρωτέωμα του στελέχους *L. monocytogenes* LQC 15015, δεν ανιχνεύθηκαν επαγόμενες πρωτεΐνες μοναδικές στην περίπτωση μη προσαρμογής (pH 7.0), ενώ σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (pH 5.0) η ύπαρξη πρωτεϊνικών μορίων όπως η μεθυλοτρανσφεράση της κυστεΐνης, που καταλύει την αντίδραση μεθυλίωσης του DNA και επιδιόρθωσης-αποκατάστασής του κατόπιν έκθεσης σε χημικούς ή φυσικούς παράγοντες, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι σε ακραίες συνθήκες περιβάλλοντος ο μικροοργανισμός κινητοποιεί προσαρμοστικούς μηχανισμούς που θα του επιτρέψουν την ανάπτυξη στις δεδομένες συνθήκες μετά από επαγωγή της ανθεκτικότητας.

Προσαρμογή του στελέχους *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 σε συνθήκες όξινης καταπόνησης είχε ως αποτέλεσμα μείωση της ωσμοανθεκτικότητάς του, και ανάπτυξή του σε υψηλότερες ελάχιστες τιμές a_w συγκριτικά με τις συνθήκες μη προσαρμογής. Παρ'όλα αυτά η προσαρμογή του στελέχους σε όξινες συνθήκες δεν φαίνεται να επηρέασε την οξεοανθεκτικότητά του η οποία παρέμεινε στα ίδια επίπεδα με τις συνθήκες μη προσαρμογής (ελάχιστη τιμή pH ανάπτυξης στο γαλακτικό και στο οξικό οξύ, 5.22 και 5.43 αντίστοιχα). Ενοφθαλμισμός προσαρμοσμένων και μη καλλιεργειών του στελέχους *S. enterica* serovar Typhimurium LQC 15100, σε υποστρώματα των οποίων το pH είχε υποστεί ρύθμιση με χρήση γαλακτικού ή οξικού οξέος, επιβεβαίωσε την παρατήρηση ότι η ικανότητα ανάπτυξής τους στο οξικό οξύ είναι σαφώς μειωμένη σε σχέση με το έτερο οργανικό οξύ και συνοδεύεται από υψηλότερες ελάχιστες τιμές pH και a_w . Σχετικά με το πρωτέωμα του στελέχους *S. enterica* serovar Typhimurium LQC 15100, δεν ανιχνεύθηκαν επαγόμενες πρωτεΐνες μοναδικές στην περίπτωση προσαρμογής σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (pH 5.0), γεγονός το οποίο πιθανότατα εξηγεί και τη

μείωση που παρατηρήθηκε στην ανεκτικότητα του βακτηρίου σε χαμηλές τιμές a_w . Για μια ακόμη φορά υπήρξε επαγωγή ενός πλήθους πρωτεϊνών (και ενζύμων), πράγμα που υποδηλώνει περαιτέρω συμμετοχή τους σε μεταβολικές διεργασίες έκφρασης γονιδίων και επαγωγής επιπλέον πρωτεϊνών.

Το στελέχος *Yersinia enterocolitica* CITY 650 επέδειξε τη μικρότερη οξεοανθεκτικότητα και ωσμοανθεκτικότητα – κυρίως κατόπιν έκθεσης του σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (pH 5.0) – μεταξύ των τεσσάρων στελεχών που μελετήθηκαν. Συγκριτικά με τις συνθήκες μη προσαρμογής, τα προσαρμοσμένα κύτταρα του στελέχους όχι μόνο δεν κατορθώνουν να ενισχύσουν την οξεοανθεκτικότητά τους, με αποτέλεσμα οι ελάχιστες τιμές pH που απαιτούνται πλέον για την ανάπτυξή τους να είναι πολύ υψηλότερες, αλλά δεν φαίνεται να ενισχύεται και η ωσμοανθεκτικότητά τους μέσω διασταυρούμενης προστασίας (cross-protection), αφού μετά την προσαρμογή η ανάπτυξη καθίσταται δυνατή μόνο σε υψηλότερες τιμές a_w συγκριτικά με την περίπτωση της μη προσαρμογής. Η ικανότητα ανάπτυξης, των προσαρμοσμένων και μη καλλιεργειών του στελέχους *Y. enterocolitica* CITY 650, σε υποστρώματα με οξικό οξύ, παραμένει μειωμένη συγκριτικά με εκείνη στα υποστρώματα των οποίων το pH έχει υποστεί ρύθμιση με γαλακτικό οξύ καταδεικνύοντας για μια ακόμη φορά, την ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση του οξικού οξέος έναντι του γαλακτικού. Όσον αφορά στο πρωτέωμα του στελέχους *Y. enterocolitica* CITY 650, όπως και στην περίπτωση του βακτηρίου *S. enterica* serovar Typhimurium LQC 15100 δεν ανιχνεύθηκαν επαγόμενες πρωτεΐνες μοναδικές στην περίπτωση προσαρμογής σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (pH 5.0) με μοναδική ίσως εξαίρεση μια πρωτεΐνη θερμικής κατάπληξης η οποία λειτουργεί και ως χαπερόνιο και εμπλέκεται στη διατήρηση της ομοιόστασης του βακτηριακού κυττάρου. Το ένζυμο καταβολική αφυδρατάση της θρεονίνης, πιθανότατα υπεύθυνο για την αύξηση της τιμής pH ενδοκυτταρικά και την επιβίωση κατ'επέκταση σε χαμηλές τιμές pH του περιβάλλοντος, δεν εντοπίζεται στο πρωτέωμα του προσαρμοσμένου σε συνθήκες όξινης καταπόνησης στελέχους, κάτι το οποίο αποτελεί ενδεχομένως εξήγηση για την παρατηρούμενη μείωση της ανθεκτικότητας που παρουσιάζει ο μικροοργανισμός συγκριτικά με τις συνθήκες μη προσαρμογής (στις οποίες το ένζυμο κωδικοποιείται).

Συμπερασματικά, εκ των τεσσάρων μελετώμενων στελεχών μόνο ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* LQC 15015 κατάφερε να αυξήσει την οξεοανθεκτικότητά και την ωσμοανθεκτικότητά του κατόπιν επίδρασης συνθηκών

ήπια όξινης καταπόνησης. Αυτή η επαγόμενη ανθεκτικότητα που παρατηρείται στο βακτήριο *L. monocytogenes* σε όξινες συνθήκες παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον κατά την επεξεργασία των τροφίμων, αφού ενδεχόμενη έκθεση του τροφιμογενούς αυτού παθογόνου σε ήπια όξινες συνθήκες περιβάλλοντος δύναται να προκαλέσει επαγωγή της ανθεκτικότητάς του σε πιο ακραία όξινες συνθήκες με σοβαρές ενδεχομένως επιπτώσεις στις βιομηχανίες επεξεργασίας, μεταποίησης και διακίνησης τροφίμων. Τα υπόλοιπα τρία στελέχη που ανήκουν στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* φαίνεται να μην είναι σε θέση να κινητοποιήσουν αντίστοιχους μηχανισμούς ανθεκτικότητας και αντοχής σε όξινες συνθήκες λόγω πιθανότατα έλλειψης ή μετάλλαξης του γονιδίου κωδικοποίησης ορισμένων ρυθμιστικών πρωτεϊνών όπως είναι οι RpoS, Fur και PhoP υπεύθυνων για τον έλεγχο διαφόρων διακριτών συστημάτων επαγωγής της οξεοανθεκτικότητας (Acid Tolerance Response - ATR) (Bearson et al., 1997). Από την παρούσα μελέτη επίσης προέκυψε ότι, όλα τα στελέχη επέδειξαν μεγαλύτερη ευαισθησία στο οξικό οξύ έναντι του γαλακτικού οξέος, πράγμα που υποδηλώνει και την ισχυρότερη αντιμικροβιακή του δράση, δοθείσης και της υφιστάμενης σχέσης μεταξύ δισταμένης και μη δισταμένης μορφής του οξέος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams M.R., Moss M.O. (2008). Food Microbiology 3rd Ed. © The Royal Society of Chemistry, 2008, ISBN 978-0-85404-284-5.
- Adams, M.R., Little, C.L. and Easter, M.C. (1991). Modelling the effect of pH, acidulant and temperature on the growth rate of *Yersinia enterocolitica*. J. Appl. Bacteriol. 71, 65–71.
- Adams, M.R. and Hall, C.J. (1988). Growth inhibition of foodborne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. Int. J. Food Sci. Technol. 23, 287–292.
- Akbas, M. Y. & Olmez, H. (2007). Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. Letters in Applied Microbiology. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02127.x.
- Álvarez-Ordóñez, A., Fernández A., Bernardo, A., López M. (2009). Comparison of acids on the induction of an Acid Tolerance Response in *Salmonella typhimurium*, consequences for food safety. Meat Science 81, 65–70.
- Anderson NL, Anderson NG (1998). Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 19 (11): 1853–61. doi :10.1002/elps.1150191103
- Arnold, C. N., McElhanon, J., Lee, A., Leonhart, R., and Siegele, D. A. (2001). Global analysis of *Escherichia coli* gene expression during acetate-induced acid tolerance response. J. Bacteriol. 183(7), 2178–2186.
- Arnold, K.W., Kasper, C.W., 1995. Starvation and stationary-phase induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. Applied and Environmental Microbiology 61, 2037–2039.
- Asplund, K., Nurmi, E., Hirn, J., Hirvi, T., Hill, P., (1993). Survival of *Yersinia enterocolitica* in fermented sausages manufactured with different levels of nitrite and different starter cultures. Journal of Food Protection 56, 710–712.
- Audia, J. P., Webb, C. C., and Foster, J. (2001). Breaking through the acid barrier: An orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. Int. J. Med. Microbiol. 291, 97–106.
- Baik, H. S., Bearson, S., Dunbar, S., & Foster, J. W. (1996). The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* provides protection against organic acids. Microbiology, 142, 3195–3200.

- Baird-Parker, A.C. (1980). Organic acids. In: J.H. Sillicker (editor), *Microbial Ecology of Foods, Factors Affecting Life and Death of Microorganisms*, Vol. 1 Academic Press, New York, pp. 126-135.
- Bearson Shawn, Bearson Bradley, Foster John W. (1997). Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 147 (1997) 173-180.
- 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, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 6005.
- Bell, C. and Kyriakides A., (2002). *Salmonella: A Practical Approach to the Organism and its Control in Foods*. Copyright © 2002 by Blackwell Publishing Ltd.
- Belle Archana, Tanay Amos, Bitincka Ledion, Shamir Ron and O’Shea Erin K. (2006). Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome. *PNAS* **103** (35): 13004–13009.
- Benjamin, M.M., Datta, A.R., 1995. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1669–1672.
- Berry, E.D., Barkocy-Gallagher, G.A., Siragusa, G.R., (2004). Stationary-phase acid resistance and injury of recent bovine *Escherichia coli* O157 and non-O157 biotype I *Escherichia coli* isolates. *Journal of Food Protection* 67, 583–590.
- Bhekisisa C. Dlamini and Elna M. Buys, (2009). Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 to acid in traditional and commercial goat milk amasi. *Food Microbiology* 26 (2009) 58–64.
- Blackstock WP, Weir MP (1999). Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.* 17 (3): 121–7. doi: 10.1016/S0167-7799(98)01245-1
- Boeker, E. A., and Snell, E. E. (1972). In “the Enzymes” (P. Boyer, Ed.), 3rd ed., Vol. VI, pp. 217–253. Academic Press, New York.
- Bolton, L.F., Frank, J.F., 1999. Simple method to observe the adaptive response of *Listeria monocytogenes* in food. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 350–353.
- Brackett, R.E. (1987). Effects of various acids on growth and survival of *Yersinia enterocolitica*. *J. Food Protect.* 50, 598-601.
- Brackett, R.E. (1986). Growth and survival of *Yersinia enterocolitica* at acidic pH. *Int. J. Food Microbiol.* 3, 243-251.
- Buchanan, R.L., Edelson, S.G., 1996. Culturing enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence and absence of glucose as a simple means of evaluating the acid

- tolerance of stationary-phase cells. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4009–4013.
- Buckingham, Steven (2003). The major world of microRNAs. <http://www.nature.com/horizon/rna/background/micrnas.html>.
- Calicioglu, M., Sofos, J. N., Samelis, J., Kendall, P. A., Smith, G. C. (2003). Effect of acid adaptation on inactivation of *Salmonella* during drying and storage of beef jerky treated with marinades. *International Journal of Food Microbiology* 89 (2003) 51– 65.
- Calicioglou, M., Sofos, J. & Kendall, P. (2003b). Fate of acid adapted and non adapted *E.coli* O157:H7 inoculated post-drying on beef jerky treated with marinades before drying. *Food Microbiology*, 20, 169–177.
- Cambronne, E. D., Cheng, L. W., and Schneewind, O. (2000). LcrQ/YscM1, regulators of the *Yersinia* yop virulon, are injected into host cells by a chaperone-dependent mechanism. *Mol. Microbiol.* 37, 263–273.
- Casadei, M.A., Ingram, R., Hitchings, E., Archer, J., Gaze, J.E., 2001. Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol. *Int. J. Food Microbiol.* 63, 125– 134.
- Casey, P. G., and Condon, S. (2002). Sodium chloride decreases the bacteriocidal effect of acid pH on *Escherichia coli* O157:H45. *Int. J. Food Microbiol.* 76, 199–206.
- Castanie-Cornet, M., Penfound, T. A., Smith, D., Elliott, J. F., and Foster, J. (1999). Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181(11), 3525–3535.
- Cataldo, G., Conte, M. P., Chiarini, F., Seganti, L., Ammendolia, M. G., Superti, F., and Longhi, C. (2007). Acid adaptation and survival of *Listeria monocytogenes* in Italian-style soft cheeses. *J. Appl. Microbiol.* 103, 185–193.
- Ceylan, E., Fung, D.Y.C., (2000). Destruction of *Yersinia enterocolitica* by *Lactobacillus sakei* and *Pediococcus acidilactici* during low-temperature fermentation of Turkish dry sausage (sucuk). *Journal of Food Science* 65, 876–879.
- Cheng Hsin-Yi and Cheng-Chun Chou, 2001. Acid adaptation and temperature effect on the survival of *E. coli* O157:H7 in acidic fruit juice and lactic fermented milk product. *International Journal of Food Microbiology* 70 (2001) 189–195.
- Cherrington, C.A., Hinton, M. and Chopra, I. (1990). Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in *E.coli*. *J. Bacteriol.* 68, 69-74.
- Chung, K.C. and Goepfert, J.M. (1970). Growth of *Salmonella* at low pH. *Journal of Food Science*, 35, 326-328.

- Chan S. K., Giannella R. A. (1981). Amino acid sequence of heat-stable enterotoxin produced by *Escherichia coli* pathogenic for man. *J Biol Chem* 256:7744–7746.
- Clemens JD, Sack DA, Harris JR, Chakraborty J, Neogy PK, Stanton B, Huda N, Khan MU, Kay BA, Khan MR, Ansaruzzaman M, Yunus M, Rao MR, Svennerholm AM, Holmgren J. (1988). Cross-protection by B subunit-whole cell cholera vaccine against diarrhea associated with heat-labile toxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli*: results of a large-scale trial. *J Infect Dis* 158:372–377.
- Conte, M.P. et al. (2002). Effect of acid adaptation on the fate of *Listeria monocytogenes* in THP-1 human macrophages activated by gamma interferon, *Infect. Immun.*, 70, 4369.
- Conte, M.P. et al. (2000). Acid tolerance in *Listeria monocytogenes* influences invasiveness of enterocyte-like cells and macrophage cells, *Microbial Pathog.* 29,137.
- Cook, K. A., Dobbs, T.E., Hlady, W.G. et al. (1998). Outbreak of *Salmonella* serotype Hartford infections associated with unpasteurized orange juice. *Journal of the American Medical Association*, 280(17), 1504-1509.
- Cooper, G.C. and Rowbury, R.J. (1986). Virulence plasmid-associated sensitivity to acid in *Escherichia coli* and its possible significance in human infections. *J. Med. Microbiol.* 22, 231-236.
- Cotter, P. D. et al. (2005). Presence of GadD1 glutamate decarboxylase in selected *Listeria monocytogenes* strains is associated with an ability to grow at low pH, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 2832.
- Cotter, P., Gahan, C.G.M., and Hill, C., (2001). A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid, *Mol. Microbiol.*, 40, 465.
- Cotter, P. D., Gahan, C.G.M., and Hill, C., (2000). Analysis of the role of the *Listeria monocytogenes* F₀F₁ ATPase operon in the acid tolerance response, *Int. J. Food Microbiol.* 60, 137.
- Davis, M. J., Coote, P. J., and O’Byrne, C. P. (1996). Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: The adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. *Microbiology* 142(Pt 10), 2975–2982.
- Day, J. B., and Plano, G. V. (2000). The *Yersinia pestis* YscY protein directly binds YscX, a secreted component of the type III secretion machinery. *J. Bacteriol.* 182, 1834–1843.

- Day NP, Scotland SM, Rowe B. (1981). Comparison of an HEp-2 tissue culture test with the Sereny test for detection of enteroinvasiveness in *Shigella* spp. and *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 13:596–597.
- De Koning-Ward and Robins-Browne R. M. (1995). Contribution of Urease to Acid Tolerance in *Yersinia enterocolitica*. Infection and Immunity, Oct. 1995, p. 3790-3795, Vol. 63, No. 10.
- De Koning-Ward, T. F., Ward, A. C., and Robins-Browne R. M. (1994). Characterization of the urease gene complex of *Yersinia enterocolitica*. Gene 145:25-32.
- Debevere, J.M. (1988). Effect of buffered system on the survival of some food poisoning bacteria in medium acid media. Food Microbiol. 5, 135-139.
- Dhingraa Vikas, Gupta Mukta, Andacht Tracy and Fu Zhen F. (2005). New frontiers in proteomics research: A perspective. International Journal of Pharmaceutics 299 (1–2): 1–18.
- Dickson, J.S., Kunduru, M.R., 1995. Resistance of acid-adapted Salmonellae to organic acid rinses on beef. J. Food Prot. 58, 973– 976.
- Donnenberg M. S., Kaper J. B., Finlay B. B., (1997). Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. Trends Microbiol 5:109-114.
- Donnenberg M. S., Kaper J. B., (1992). Enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun 60:3953–3961.
- Drosinos, E.H., Mataragas, M., Veskovic-Moracanin, S., Gasparik-Reichardt, J., Hadziosmanovic, M., Alagic, D., (2006). Quantifying nonthermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in European fermented sausages using bacteriocinogenic lactic acid bacteria or their bacteriocins: a case study for risk assessment. Journal of Food Protection 69, 2648–2663.
- EI-Ziney, M.G., De Meyer, H. and Debevere, J. (1997). Growth and survival kinetics of *Yersinia enterocolitica* IP 383 O: 9 as affected by equimolar concentrations of undissociated short-chain organic acids. International Journal of Food Microbiology 34 (1997) 233-247.
- EI-Ziney, M.G., De Meyer, H. and Debevere, J. (1995). Kinetics of interactions of lactic acid, pH and atmosphere on the growth and survival of *Yersinia enterocolitica* IP 383 O: 9 at 4°C. Int. J. Food Microbiol. 27, 229-244.
- Eslava CA, Villaseca J, Morales R, Navarro A, Cravioto A. (1993). Identification of a protein with toxigenic activity produced by enteroaggregative *Escherichia coli*,

- abstr. B-105. In: Abstracts of the 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 44.
- Faleiro, M. L., Andrew, P.W., and Power, D. (2003). Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 207–216.
- Fällman, M., and Gustavsson, A., (2005). Cellular Mechanisms of Bacterial Internalization Counteracted by *Yersinia*. *International Review of Cytology*, Vol. 246, doi: 10.1016/S0074-7696(05)46004-0.
- Farber, J. M., Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. *Microbiol Rev* 55: 476–511.
- Farber, J.M., Sanders, G.W., Dunfield, S., Prescott, R., 1989. The effect of various acidulants on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 9, 181–183.
- Ferreira, A. et al. (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.
- Flahaut, S., Hartke, A., Giard, J. C., Benachour, A., Boutibonnes, P., and Auffray, Y. (1996). Relationship between stress response toward bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 138, 49–54.
- Foley, D. M., Trimboli, S. L., Lamb, J., Gogley, J., Thompson, J., Caporaso, F., Calicchia, M., and Prakash, A. (2005). Acid-adaptation does not increase the resistance of *Listeria monocytogenes* to irradiation in a seafood salad. *Int. J. Food Microbiol.* 99, 147–156.
- Formato, G., Geornaras, I., Barmpalia, I. M., Skandamis, P. N., Belk, K. E., Scanga, J. A., Kendall, P. A., Smith, G. C., and Sofos, J. N. (2007). Effect of acid adaptation on growth during storage at 10 degrees C and resistance to simulated gastric fluid of *Listeria monocytogenes* inoculated onto bologna formulated with or without antimicrobials. *J. Food Prot.* 70, 65–69.
- Foster, J. W., (2001). Acid stress responses of *Salmonella* and *E.coli*: Survival mechanisms, regulation, and implications for pathogenesis. *Microbiol. Soc. Korea* 39(2), 89–94.
- Foster, J. W. et al. (1994). Regulatory circuits involved with pH-regulated gene expression in *Salmonella typhimurium*, *Microbiology*, 140, 341.

- Foster, J. W., (1993). The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* involves transient synthesis of key acid shock proteins. *J. Bacteriol.* 175, 1981–1987.
- Foster, J. W., (1991). *Salmonella* acid shock proteins are required for the acid tolerance response, *J. Bacteriol.*, 173, 6896.
- Foster, J. W., and Hall, H. K. (1990). Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 172, 771–778.
- Fournier, M. L., Gilmore, J. M., Martin-Brown, S. A., Washburn, M. P., (2007). Multidimensional separations-based shotgun proteomics. *Chem. Rev.* 107 (8): 3654–86.
- Francis, M. S., Lloyd, S. A., and Wolf-Watz, H. (2001). The type III secretion chaperone LcrH co-operates with YopD to establish a negative, regulatory loop for control of Yop synthesis in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 42, 1075–1093.
- Freese, E., Sheu, C.W. and Galliers, E. (1973). Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature (London)* 241, 321-325.
- 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 fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3128–3132.
- Gajiwala, K. S., and Burley, S. K. (2000). HDEA, a periplasmic protein that supports acid resistance in pathogenic enteric bacteria. *J. Mol. Biol.* 295, 605–612.
- Gauthier, M. J. and Clement, R. L. (1994). Effect of a short period of starvation in oligotrophic waters on the resistance of enteric bacterial pathogens to gastric pH conditions. *FEMS Microbiology Ecology* 14 (1994), 275-284.
- George, S. M., Lund, B. M., and Brocklehurst, T. F. (1988). The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 6, 153–156.
- Geornaras, I., Belk, K.E., Scanga, J.A., Kendall, P.A., Smith, G.C., Sofos, J.N., 2005. Postprocessing antimicrobial treatments to control *Listeria monocytogenes* in commercial vacuum-packed bologna and ham stored at 10 1C. *J. Food Prot.* 68, 991–998.

- Glansdorff, N. (1996). Biosynthesis of arginine and polyamines. In “*Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology” (F. C. Neidhardt, Ed.), 2nd ed., Vol. 1, pp. 408–484. ASM Press, Washington, D.C.
- Golden, M. H., Buchanan, R. L., & Whiting, R. C. (1995). Effect of sodium acetate or sodium propionate with EDTA and ascorbic acid on the inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Safety*, 15, 53–65.
- Gorden, J. and Small, P. L. C. (1993). Acid resistance in enteric bacteria. *Infect. Immun.* 61, 364-367.
- Greatorex JS, Thorne GM. (1994). Humoral immune response to Shiga-like toxins and *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in hemolytic-uremic syndrome patients and healthy subjects. *J Clin Microbiol* 32: 1172–1178.
- Greenacre, E. J., Brocklehurst, T. F., (2006). The acetic acid tolerance response induces cross-protection to salt stress in *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology* 112, 62-65.
- Greenacre, E. J., Brocklehurst, T. F., Waspe, C. R., Wilson, D. R., & Wilson, P. D. G. (2003). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* acid tolerance response induced by organic acids at 20°C: optimization and modeling. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3945–3951.
- Groisman, E. A. and Ochman H. (1997). How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol* 5(9):343–349.
- Gruening, P. et al. (2006). Structure, regulation and putative function of the arginine deiminase system of *Streptococcus suis*. *J. Bacteriol.*, 188, 361.
- Hanna, M.O., Stewart, J.C., Carpenter, Z.L. and Vanderzanl, C. (1977). Effect of heating, freezing and pH on *Yersinia enterocolitica* like organisms from meat. *J. Food Protect.* 10, 689-692.
- Henderson IR, Czeczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP. (1999). Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 67:5587–5596.
- Hengge-Aronis, R. (1996). Back to log phase: σ^S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 21, 887-893.
- Hersh, B. M., Faroo, F. T., Barsatd, D. N., Blankhorn, D. L., and Slonczewski, J. L. (1996). A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178(13), 3978–3981.

- Hicks S, Candy DC, Phillips AD. (1996). Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. *Infect Immun* 64:4751–4760.
- Hof, H. (2003). History and epidemiology of listeriosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35, 199–202.
- Hsin-Yi Cheng, Roch-Chui Yu, Cheng-Chun Chou, 2003. Increased acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by acid adaptation time and conditions of acid challenge. *Food Research International* 36 (2003) 49–56.
- Hu L, Ye M, Jiang X, Feng S, Zou H (2007). Advances in hyphenated analytical techniques for shotgun proteome and peptidome analysis--a review. *Anal. Chim. Acta* 598 (2): 193–204.
- Hueck, C. J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 379–433.
- Iriarte M., and Cornelis, G. R., (1999). Identification of SycN, YscX, and YscY, three new elements of the *Yersinia* Yop virulon. *J. Bacteriol.* (1999) 181: 675-680.
- Iriarte, M., Stainier, I., and Cornelis, G. R., (1995). The *rpoS* gene from *Yersinia enterocolitica* and its influence on expression of virulence factors. *Infect. Immun.* 63:1840–1847.
- James, P. (1997). Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Quarterly reviews of biophysics* 30 (4): 279–331. doi: 10.1017/S0033583597003399.
- Jarvis KG, Kaper JB. (1996). Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect Immun* 64:4826–4829.
- Jordan, S. L., Glover, J., Malcolm, L., Thomson-Carter, F.M., Booth, I.R., Park, S.F., (1999). Augmentation of killing of *Escherichia coli* O157 by combinations of lactate, ethanol, and low-pH conditions. *Applied and Environmental Microbiology.* 65, 1308-1311.
- Jores Joerg, Rumer Leonid, Wieler Lothar H. (2004). Impact of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island on the evolution of pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology* 294 (2004) 103–113.
- Jung, Y.J., Min, K.J., Yoon, K.S., (2009). Responses of acid stressed *Salmonella Typhimurium* in broth and chicken patties to subsequent antimicrobial stress with ϵ -polylysine and combined potassium lactate and sodium diacetate. *Food Microbiology* (2009), doi: 10.1016/j.fm.2009.02.007.

- Jung, Y.S. and Beuchat, L.R. (2000). Sensitivity of multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 to organic acids and thermal inactivation in liquid egg products. *Food Microbiology*, 17, 63-71.
- Karapinar, M., and Gonul, S. A. (1992). Effects of sodium bicarbonate, vinegar, acetic and citric acids on growth and survival of *Yersinia enterocolitica*. *International Journal of Food Microbiology*, 16 (1992) 343-347.
- Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C. (1983a). Sporadic cases of haemolytic uremic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* i: 619–620.
- Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Steele BT. (1983b). *Escherichia coli* cytotoxin, haemolytic-uraemic syndrome, and haemorrhagic colitis. *Lancet* ii: 1299–1300.
- Kathariou, S. (2002). *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *J. Food. Prot.* 65, 1811–1829.
- Kazmierczak, M. J. et al. (2003). *Listeria monocytogenes* σ^B regulates stress response and virulence functions, *J. Bacteriol.*, 185, 5722.
- Kendall, M. and Gilbert, R.J. (1980). Survival and growth of *Yersinia enterocolitica* in broth media and in food. In: G.W. Gould and J.E.L. Corry (Eds.) *Microbial Growth and Survival in Extremes of Environment* Academic Press, New York, pp. 215-226.
- Kirkpatrick, C., Maurer, L. M., Oyelakin, N. E., Yoncheva, Y. N., Maurer, R., and Slonczewski, J. L. (2001). Acetate and formate Stress: Opposite responses in the proteome of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183(21), 6466–6477.
- Konowalchuk J, Speirs JJ, Stavric S. (1977). Vero response to cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 18: 775–779.
- Koutsoumanis, K. P., and Sofos, J. N. (2005). Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and aw limits for growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 104, 83–91.
- Koutsoumanis, K. P., Kendall P. A., Sofos J. N. (2004). A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and a_w when grown in suspension or on a solid surface. *Food Microbiology* 21 (2004) 415–422.

- Koutsoumanis, K. P., Kendall, P. A., and Sofos, J. N. (2003). Effect of food processing-related stresses on acid tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7514–7516.
- Kroll, R.G., and Patchett, R.A., (1992). Induced acid tolerance in *Listeria monocytogenes*, *Lett. Appl. Microbiol.*, 14, 224.
- Kubitschek, H. E. (1990). Cell volume increase in *Escherichia coli* after shifts to richer media. *J. Bacteriol.* 172 (1): 94–101.
- Lazure C, Seidah NG, Chretien M, Lallier R, ST-Pierre S. (1983). Primary structure determination of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin of porcine origin. *Can J Biochem Cell Biol* 61:287–292.
- Lee, I. S., Lin, J., Hall, H. K., Bearson, B., and Foster, J. W. (1995). The stationary-phase sigma factor sigma S (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 17, 155–167.
- Leistner, L., 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 181–186.
- Leyer, G. J., Johnson, E. A., 1997. Acid adaptation sensitizes *Salmonella typhimurium* to hypochlorous acid. 63, 461–467.
- Leyer, G.J., Johnson, E.A., 1993. Acid adaptation induces crossprotection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1842–1847.
- Lindqvist Roland and Lindblad Mats, (2009). Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in fermented sausages during maturation/storage. *International Journal of Food Microbiology* 129 (2009) 59–67.
- Little, C.L., Adams, M.R. and Easter, M.C. (1992). The effect of pH, acidulant, and temperature on the survival of *Yersinia enterocolitica*. *Lett. Appl. Microbiol.* 14, 148-152.
- Lin, J., Smith, M. P., Chapin, K. C., Baik, H. S., Bennett, G. N., and Foster, J. (1996). Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(9), 3094–3100.
- Lin, J., Lee, I. S., Frey, J., Slonczewski, J. L., and Foster, J. (1995). Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177(14), 4097–4104.

- Lou, Y., and Yousef, A. E. (1997). Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1252–1255.
- Lovett J. (1989). *Listeria monocytogenes*. In: MP Doyle, ed. *Foodborne Bacterial Pathogens*. New York: Marcel Dekker Inc., 1989, pp. 284–310.
- Madigan, M. T., and Martinko, J. M. (2006). *Brock Biology of microorganisms* (11th Ed.). Pearson. ISBN 0-13-196893-9.
- Marinus MG (1996). Methylation of DNA. In: *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. American Society for Microbiology; 1996. p. 782–91.
- McClure, P.J., Roberts, T.A., Oguru, O., 1989. Comparison of the effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and in liquid medium. *Letters in Applied Microbiology* 9, 95–99.
- McLauchlin, J., Mitchell, R. T., Smerdon, W. J., and Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: A review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int. J. Food Microbiol.* 92, 15–33.
- McMeekin, T.A., Olley, J., Ratkowsky, D.A., Ross, T., 2002. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology* 73, 395–407.
- McMeekin, T.A., Presser, K., Ratkowsky, D., Ross, T., Salter, M., Tienungoon, S., 2000. Quantifying the hurdle concept by modelling the bacterial growth/no growth interface. *International Journal of Food Microbiology* 55, 93–98.
- Mead P. S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L. F., Bresee J. S., Shapiro C., Griffin P. M., Tauxe R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5:607–625.
- Membre, J. M., Leporq, B., Vialette, M., Mettler, E., Perrier, L., Thuault, D., and Zwietering, M. (2005). Temperature effect on bacterial growth rate: Quantitative microbiology approach including cardinal values and variability estimates to perform growth simulations on/in food. *Int. J. Food Microbiol.* 100, 179–186.
- Membre, J. M., Majchrzak, V. and Jolly, I. (1997). Effects of temperature, pH, glucose, and citric acid on the inactivation of *Salmonella typhimurium* in reduced calorie mayonnaise. *Journal of Food Protection*, 60(12), 1497- 1501.
- Merrell, D. S., Butler, S. M., Qadri, F., Dolganov, N. A., Alam, A., Cohen, M. B., Calderwood, S. B., Schoolnik, G. K., and Camilli, A. (2002). Host-induced epidemic spread of the cholera bacterium. *Nature* 417, 642–645.

- Miliotis, M. D., and Bier, J. W. (2003). International Handbook of Foodborne Pathogens. © Copyright 2003 by Marcel Dekker, Inc. ISBN: 0-8247-0685-4.
- Miller, L. G., Kaspar, C. W., 1994. *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. *Journal of Food Protection* 57, 460–464.
- Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P, Levine MM. (1987). Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J* 6:829–831.
- Navarro-Garcia, F., Sears, C., Eslava, C., Cravioto, A., Nataro, J. P. (1999). Cytoskeletal effects induced by Pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 67:2184–2192.
- Neidhardt, F.C. (1987). Multigene systems and regulons. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology* (Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Magasanik, B., Low, K.B., Schaechter, M. and Umberger, H.E. (Eds.), pp. 1313-1317. Am. Soc. Microbiol., Washington, DC.
- Nesvizhskii, A. I. (2007). Protein identification by tandem mass spectrometry and sequence database searching. *Methods Mol. Biol.* 367: 87–119.
- O’Byrne, Conor P. and Karatzas, Kimon A. G. (2008). The Role of Sigma B (σ^B) in the Stress Adaptations of *Listeria monocytogenes*: Overlaps between Stress Adaptation and Virulence. *Advances in Applied Microbiology*, ISSN 0065-2164, DOI: 10.1016/S0065-2164(08)00605-9.
- 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.
- O’Driscoll, B., Gahan, C. G., and Hill, C. (1996). Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: Isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1693–1698.
- Ochman, H., Soncini, F. C., Solomon, F., Groisman, E. A. (1996). Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(15):7800–7804.
- Parish, M.E., Narciso, J.A. and Friedrich, L.M. (1997). Survival of salmonellae in orange juice. *Journal of Food Safety*, 17, 273-281.
- Park, Yong-K., Bearson, B., Bang, S.H., Bang, I.S. and Foster, J.W. (1996). Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 20, 605-611.

- Phan-Thanh, L., Mahouin, F., Aligé, S., 2000. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 55, 121–126.
- Restaino, L., Komatsu, K.K. and Syracuse, M.J. (1981) Effects of acids on potassium sorbate inhibition of food-related microorganisms in culture media. J. Food Sci. 47, IM-143.
- Pinner R.W., Schuchat A., Swaminathan B., Hayes P.S., Deaver K.A., Weaver R.E., Pilkaytis B.D., Reeves M., Broome C.V., Wengerand J. (1992). The *Listeria* study group. Roles of foods in sporadic listeriosis. II. Microbiologic and epidemiologic investigation. JAMA 267:2046–2050.
- Richard, H. T., and Foster, J. W., (2003). Acid Resistance in *Escherichia coli*. Advances in applied Microbiology, Volume 52 Copyright 2003, Elsevier (USA).
- Ricke, S. C. (2003). Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. Poultry Science, 82, 632–639.
- Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N Engl J Med 308:681–685.
- Roccourt J., Cossart P. (1997). *Listeria monocytogenes*. In MP Doyle, LR Beuchat, TJ Montville, eds. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. Washington, DC: ASM Press, pp. 337–352.
- Rogers Simon, Girolami Mark, Kolch Walter, Waters Katrina M., Liu Tao, Thrall Brian and Wiley H. Steven (2008). Investigating the correspondence between transcriptomic and proteomic expression profiles using coupled cluster models. Bioinformatics 24 (24): 2894–2900.
- Rowbury R. J. (2001). Extracellular sensing components and extracellular induction component alarmones give early warning against stress in *Escherichia coli*. Advances in microbial physiology vol. 44, copyright © 2001 Academic Press ISBN 0-12 027744-1.
- Rowbury, R.J. (1999a). Acid tolerance induced by metabolites and secreted proteins and how tolerance can be counteracted. In: Bacterial Responses to pH. Novartis Found. Symp. 221, 93-111.
- Rowbury, R.J. and Goodson, M. (1999b). An extracellular stress-sensing protein is activated by heat and uv irradiation as well as by mild acidity, the activation producing an acid tolerance-inducing protein. Lett. Appl. Microbiol. 29, 10-14.

- Rowbury, R.J. and Goodson, M. (1997). Metabolites and other agents which abolish the CysB-regulated acid tolerance induced by low pH in *Escherichia coli*. *Recent Res. Develop. Microbiol.* 1, 1-12.
- Ryan, S., Hill, C. and Gahan, C. G. M. (2008). *Advances in Applied Microbiology*, ISSN 0065-2164, doi: 10.1016/S0065-2164(08)00603-5.
- Ryan, S., Ph.D. thesis (2006). Molecular and phenotypic characterisation of selected acid resistance systems in *Listeria monocytogenes*, University College Cork, Cork, Ireland.
- Ryu J.-H., Dengand Y. and Beuchat L.R. (1999). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dried beef powder as affected by water activity, sodium chloride content and temperature. *Food Microbiology*, 16, 309-316.
- Salaun Laurence, Snyder Lori A.S. and Saunders Nigel J. (2003). Adaptation by Phase Variation in Pathogenic Bacteria. *Advances in Applied Microbiology*, 0065-2164/03, Volume 52.
- Samelis, J., Ikeda, J.S., Sofos, J.N., 2003. Evaluation of the pH-dependent, stationary phase acid tolerance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* DT104 induced by culturing in media with 1% glucose: a comparative study with *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology* 95, 563–575.
- Schlech, W. F. III (2000). Foodborne listeriosis. *Clin Infect Dis* 31:770–775.
- Shadbolt, C., Ross, T., McMeekin, T.A., 2001. Differentiation of the effects of lethal pH and water activity: food safety implications. *Letters in Applied Microbiology* 32, 99–102.
- Shea, J. E., Hensel, M., Gleeson, C., Holden, D. W. (1996). Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(6):2593–2597.
- Shi, X., and Bennett, G. N. (1994). Effects of rpoA and cysB mutations on acid induction of biodegradative arginine decarboxylase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176(22), 7017–7023.
- Sixma TK, Kalk KH, van Zanten BA, Dauter Z, Kingma J, Witholt B, Hol WG (1993). Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. *J Mol Biol* 230:890–918.
- Skandamis, P. N., Yoon, Y., Stopforth, J. D., Kendall, P. A., and Sofos, J. N. (2008). Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiol.* 25, 294–303.

- Skandamis, P.N., Stopforth, J.D., Kendall, P.A., Belk, K.E., Scanga, J.A., Smith, G.C., Sofos, J.N., (2007). Modeling the effect of inoculum size and acid adaptation on growth/no growth interface of *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology* 120, 237–249.
- Sleator, R. D., Gahan, C. G., and Hill, C. (2003). A postgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1–9.
- Small, P. L. C. (1994). How many bacteria does it take to cause diarrhea and why? p. 479–489. In V. L. Miller, J. B. Kaper, D. A. Portnoy, and R. R. Isberg (ed.), *Molecular genetics of bacterial pathogenesis*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Small, P., Blankenhorn, D., Welty, D., Zinser, E., and Slonczewski, J. L. (1994). Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: Role of rpoS and growth pH. *J. Bacteriol.* 176, 1729–1737.
- Smith, D. K., Kassam, T., Singh, B., and Elliott, J. F. (1992). *Escherichia coli* has two homologous glutamate decarboxylase genes that map to distinct loci. *J. Bacteriol.* 174(18), 5820–5826.
- Smulders, F. J. M., & Greer, G. G. (1998). Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 149–169.
- Sokolovic, Z. et al., (1993). Surface-associated, PrfA-regulated proteins of *Listeria monocytogenes* synthesized under stress conditions, *Mol. Microbiol.*, 8, 219, 1993.
- Sokolovic, Z. et al., (1990). Synthesis of species-specific stress proteins by virulent strains of *Listeria monocytogenes*, *Infect. Immun.*, 58, 3582, 1990.
- Stern, N.J., Pierson, M.D. and Kotula, A.W. (1980). Effects of pH and sodium chloride on *Yersinia enterocolitica* growth at room and refrigeration temperatures. *J. Food Sci.* 45, 64-67.
- Stim-Herndon, K. P., Flores, T. M., and Bennett, G. N. (1996). Molecular characterization of adiY, a regulatory gene which affects expression of the biodegradative acidinduced arginine decarboxylase gene (adiA) of *Escherichia coli*. *Microbiology* 142, 1311–1320.
- Stopforth, J.D., Yoon, Y., Barmpalia, I.M., Samelis, J., Skandamis, P.N., Sofos, J.N., (2005). Reduction of *Listeria monocytogenes* populations during exposure to a

- simulated gastric fluid following storage of inoculated frankfurters formulated and treated with preservatives. *Int. J. Food Microbiol.* 99, 309–319.
- Tauschek M, Gorrell R, Robins-Browne RM, (2002). Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *PNAS* 99: 7066-7071. doi:10.1073/pnas.092152899.
- Tienungoon, S., Ratkowsky, D. A., McMeekin, T. A., and Ross, T. (2000). Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4979–4987.
- Tiganitas, Alexandros, Zeaki, Nikoleta, Gounadaki, Antonia, S., Drosinos, Eleftherios H., Skandamis, Panagiotis N., (2009). Study of the effect of lethal and sublethal pH and a_w stresses on the inactivation or growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium*, *International Journal of Food Microbiology*, (2009) doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.016.
- Tompkin, R. B. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *J. Food. Prot.* 65, 709–725.
- Torres, A. G. (2008). The cad locus of Enterobacteriaceae: More than just lysine decarboxylation. *Anaerobe* (2008).
- Tramonti, A., Visca, P., De Canio, M., Falconi, M., and De Biase, D. (2002). Functional characterization and regulation of gadX, a gene encoding an AraC/XylS-Like transcriptional activator of the *Escherichia coli* glutamic acid decarboxylase system. *J. Bacteriol.* 184(10), 2603–2613.
- Tzipori S, Montanaro J, Robins-Browne RM, Vial P, Gibson R, Levine MM. (1992). Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model. *Infect Immun* 60:5302–5306.
- Velazquez, L. C., Barbini, N. B., Escudero, M. E., Estrada, C. L., Stefanini de Guzmán, A. M. (2009). Evaluation of chlorine, benzalkonium chloride and lactic acid as sanitizers for reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* on fresh vegetables. *Food Control* 20 (2009) 262–268.
- Villaseca JM, Navarro-Garcia F, Mendoza-Hernandez G, Nataro JP, Cravioto A, Eslava C. (2000). Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. *Infect Immun* 68:5920–5927.
- Virto, R., Sanz, D., Alvarez, I., Condon, S., & Raso, J. (2005). Inactivation kinetics of *Yersinia enterocolitica* by citric acid and lactic acid at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 251–257.

- Wempkamp-Kamphuis, H. H. et al. (2004). Identification of sigma factor σ^B -controlled genes and their impact on acid stress, high hydrostatic pressure and freeze survival in *Listeria monocytogenes* EGD-e, Appl. Environ. Microbiol. 70, 3457.
- Wilkins Marc R., Pasquali Christian, Appel Ron D., Ou Keli, Golaz Olivier, Sanchez Jean-Charles, Yan Jun X., Gooley Andrew. A., Hughes Graham, Humphery-Smith Ian, Williams Keith L. & Hochstrasser Denis F. (1996). From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis. Nature Biotechnology **14** (1): 61–65.
- Young, G. M., Amid, D., Miller, V. L., (1996). A bifunctional urease enhances survival of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Morganella morganii* at low pH. J Bacteriol 178:6487–6495.
- Yuk, H. G., & Schneider, K. R. (2006). Adaptation of *Salmonella* spp. in juice stored under refrigerated and room temperature enhances acid resistance to simulated gastric fluid. Food Microbiology, 23, 694–700.