

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του
Ανθρώπου

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής
Τροφίμων και Ποτών

Μεταπτυχιακή Διατριβή

*Εκτίμηση υποθανάτιων καταπονήσεων που σχετίζονται με το περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων που προκαλούν κυτταρικό τραυματισμό και ή/και απώλεια καλλιεργησιμότητας σε εργαστηριακά υποστρώματα στον παθογόνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*.*

Ελένη Ν. Ουρανού

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

**«Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων & Διατροφής του
Ανθρώπου»**

Επιβλέπων Καθηγητής: Σκανδάμης Παναγιώτης

Αθήνα, 2018

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και
Ποτών

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

«Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου»

Κατεύθυνση: Συστήματα Διαχείρισης Ασφάλειας και Ποιότητας Τροφίμων

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Εκτίμηση υποθανάτιων καταπονήσεων που σχετίζονται με το περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων που προκαλούν κυτταρικό τραυματισμό και ή/και απώλεια καλλιεργησιμότητας σε εργαστηριακά υποστρώματα στον παθογόνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*.

Ελένη Ν. Ουρανού

Επιβλέπων καθηγητής

Σκανδάμης Παναγιώτης (Αναπληρωτής Καθηγητής)

Αθήνα, 2018

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Εκτίμηση υποθανάτιων καταπονήσεων που σχετίζονται με το περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων που προκαλούν κυτταρικό τραυματισμό και ή/και απώλεια καλλιεργησιμότητας σε εργαστηριακά υποστρώματα στον παθογόνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*.

Ελένη Ν. Ουρανού

Επιβλέπων καθηγητής

Σκανδάμης Παναγιώτης (Αναπληρωτής Καθηγητής)

Εξεταστική Επιτροπή

Σκανδάμης Παναγιώτης (Αναπληρωτής Καθηγητής)

Δροσινός Ελευθέριος (Αναπληρωτής Καθηγητής)

Τσακαλίδου Ευθυμία (Καθηγήτρια)

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της διπλωματικής εργασίας μου κ Παναγιώτη Σκανδάμη, Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την υποστήριξη και την καθοδήγηση που μου παρείχε σε όλη την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών για τις γνώσεις και την βοήθεια που έλαβα. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Υποψήφια Διδάκτορα Δανάη Σιδεράκου, η οποία υπήρξε η στενότερη συνεργάτης μου, και προσέφερε απλόχερα τις γνώσεις και την εμπειρία της, κόπο και χρόνο για την περάτωση των πειραμάτων. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, τον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Δροσινό και την Καθηγήτρια κα. Τσακαλίδου.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	7
Abstract.....	10
1. Εισαγωγή.....	12
1.1 Ο μικροοργανισμός <i>Listeria monocytogenes</i>	12
1.1.1 Ταξινόμηση και ιστορική αναδρομή.....	12
1.1.2. Φυσιολογία και χαρακτηριστικά του παθογόνου μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i>	13
1.1.3 Οικολογικοί θώκοι του μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i>	13
1.1.4. Λιστερίωση.....	16
1.1.5 Η Λιστερίωση τα τελευταία χρόνια.....	18
1.1.6. Κρούσματα Λιστερίωσης την δεκαετία 2010-2018.....	20
1.2 Η έννοια της καταπόνησης.....	20
1.2.1 Επίδραση των καταπονήσεων στην φυσιολογία των μικροοργανισμών.....	22
1.3 Η έννοια του τραυματισμού	22
1.3.1. Αξιολόγηση του υποθανάτιου τραυματισμού.....	25
1.4. Η επίδραση των καταπονήσεων σχετικών με περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων στην φυσιολογία του παθογόνου μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i>	26
1.4.1 Απολυμαντικά.....	26
1.4.1.1 Quaternary Ammonium Compounds (QACs)-Τεταρτοταγείς ενώσεις αμμωνίου.....	26
1.4.1.2 Benzalkonium Chloride (BC).....	27
1.4.2. Χρήση οξέων για την καταπολέμηση παθογόνων μικροοργανισμών στην βιομηχανία τροφίμων.....	28
1.4.2.2.Γαλακτικό οξύ (lactic acid).....	28
1.4.3. Ωσμωτική καταπόνηση.....	29
1.4.4.Λιμός (Starvation).....	30
1.4.5 Θερμικό σοκ.....	32
1.5 Η σημασία της θερμοκρασίας και του μέσου στην μελέτη της επιβίωσης και του τραυματισμού του μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i>	32

1.6. Υπόθεση Εργασίας.....	36
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	38
2.1 Στελέχη <i>Listeria monocytogenes</i>	38
2.2 Προετοιμασία Εμβολίου.....	38
2.3. Πειραματική διαδικασία.....	38
2.4. Θρεπτικά Υποστρώματα/ διαλύματα.....	39
2.5 Καθορισμός MNIC.....	41
2.6. Παράγοντες καταπόνησης.....	41
2.6.1. Γαλακτικό οξύ- Lactic Acid pH 3.0.....	41
2.6.2. Benzalkonium Chloride $c=10^{-3}$ $\mu\text{g/ml}$, 10ppm.....	42
2.6.3 Έκθεση σε θερμοκρασία 55 °C.....	43
2.6.4. Λιμός- Starvation και ωσμωτική καταπόνηση	44
2.7 Ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	45
3.Αποτελέσματα.....	47
3.1 Καθορισμός MNIC (Maximum non inhibitory concentration) στα στελέχη ScottA και EGD-e του παθογόνου μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i> στην στατική φάση ανάπτυξης.....	47
3.2 Αξιολόγηση του υποθανάτιου τραυματισμού στα στελέχη ScottA και EGD-e του παθογόνου μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i> έπειτα από όξινη καταπόνηση.....	49
3.3. Αξιολόγηση του υποθανάτιου τραυματισμού στα στελέχη ScottA και EGD-e του παθογόνου μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i> έπειτα από έκθεση στον απολυμαντικό παράγοντα Benzalkonium Chloride.....	55
3.4 Αξιολόγηση του υποθανάτιου τραυματισμού στα στελέχη ScottA και EGD-e του παθογόνου μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i> έπειτα από θέρμανση στους 55°C.....	62
3.5 Αξιολόγηση του υποθανάτιου τραυματισμού στα στελέχη ScottA και EGD-e του παθογόνου μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i> έπειτα από καταπόνηση λιμού.....	66
3.6 Αξιολόγηση του υποθανάτιου τραυματισμού στα στελέχη ScottA και EGD-e του παθογόνου μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i> έπειτα από καταπόνηση λιμού παρουσία 7% NaCl.....	74

3.7 Σύγκριση της επιβίωσης και του υποθανάτιου τραυματισμού μεταξύ των διαφορετικών καταπονήσεων στα στελέχη ScottA και EGD-e του παθογόνου μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i>	81
3.7.1.Επίδραση της καταπόνησης στον υποθανάτιο τραυματισμό.....	81
3.7.2Επίδραση της προσθήκης άλατος στον τραυματισμό που προκαλείται από έκθεση σε λιμό.....	82
3.7.3 Σύγκριση των συνθηκών που οδήγησαν σε υποθανάτιο τραυματισμό ανά περίπτωση.....	83
3.7.4 Σχέση του πληθυσμιακού μεγέθους με τον τραυματισμό.....	86
4. Συζήτηση.....	89
5. Βιβλιογραφία.....	94
Υπόμνημα	103

Περίληψη

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Listeria (L.) monocytogenes* τροφιμογενούς προέλευσης συναντάται σε ένα ευρύ φάσμα οικολογικών θώκων περιλαμβανομένου του νερού, του χώματος, της βλάστησης και των ζώων. Χώροι επεξεργασίας τροφίμων, μη επεξεργασμένα τρόφιμα και τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση (RTE) εύκολα επιμολύνονται με το βακτήριο μέσω φορέων. Η λιστερίωση είναι μία αυξανόμενη απαντώμενη και δυνητικά θανατηφόρος ασθένεια η οποία προκαλείται από λοίμωξη με τον μικροοργανισμό *L. monocytogenes*.

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* δύναται να επιβιώσει κάτω από πληθώρα συνθηκών που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων με σκοπό την επεξεργασία τροφίμων και την βεβαίωση της ασφάλειας. Οι συνθήκες αυτές περιλαμβάνουν υψηλές θερμοκρασίες, όξινα περιβάλλοντα, προσθήκη αλάτων, περιβάλλοντα με απουσία θρεπτικών στοιχείων και χρήση απολυμαντικών. Για το βακτήριο όλα τα παραπάνω θεωρούνται καταπονήσεις.

Υπό συνθήκες καταπόνησης, το μικροβιακό κύτταρο δύναται να παραμείνει υγιές, εάν η καταπόνηση είναι ήπια, λόγω της ενεργοποίησης μηχανισμών ανάδρασης. Οι φυσιολογικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα στο κύτταρο, του επιτρέπουν να προσαρμοστεί στις νέες συνθήκες του περιβάλλοντος και να αποκτήσει ανθεκτικότητα στην συγκεκριμένη καταπόνηση, μεταξύ άλλων. Ωστόσο, όταν η καταπόνηση είναι εντονότερη, τα κύτταρα τραυματίζονται υποθανάτια. Αυτό σημαίνει ότι πολλά κυτταρικά συστατικά και μεταβολικά μονοπάτια χάνουν μέρος της λειτουργικότητας τους ανάλογα με τον τρόπο δράσης της καταπόνησης. Ο τραυματισμός είναι ένα αναστρέψιμο φαινόμενο, δηλαδή εάν τα κύτταρα δεν θανατωθούν, αλλά αντ' αυτού τραυματιστούν υποθανάτια κατά την επεξεργασία τροφίμων ή τις διαδικασίες απολύμανσης των χώρων επεξεργασίας τροφίμων, μπορούν να ανακάμψουν. Η κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν τραυματισμένους υποπληθυσμούς του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, ενέχει κινδύνους για την δημόσια ασφάλεια, συνεπώς η ύπαρξη τραυματισμένων κυττάρων στα τρόφιμα αποτελεί απειλή για την ασφάλεια των τροφίμων.

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η ποσοτική αξιολόγηση του υποθανάτιου τραυματισμού σε κύτταρα του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* υπό συνθήκες καταπόνησης που σχετίζονται με την επεξεργασία και περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων. Συγκεκριμένα, δύο βακτηριακά στελέχη, το ScottA (ορότυπος 4b) και το EGD-e (ορότυπος 1/2a) υποβλήθηκαν σε θερμική καταπόνηση, όξινη καταπόνηση από γαλακτικό οξύ pH 3.0, στον συχνά χρησιμοποιούμενο απολυμαντικό παράγοντα Benzalkonium Chloride (BC), σε λιμό και σε συνθήκες λιμού με προσθήκη άλατος. Ο παράγοντας καταπόνησης διαλύθηκε σε ένα από τα δύο μέσα, το Ringer και το νερό Microcosm και έπειτα από την αρχική έκθεση του εμβολίου, το μέγεθος του οποίου ήταν 10^9 βακτηριακά κύτταρα μέσης στατικής φάσης, τα βακτήρια επώζονταν σε δύο θερμοκρασίες 4°C ή 20°C. Ένας επιπλέον στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η σύγκριση του υποθανάτιου τραυματισμού στις διαφορετικές πειραματικές συνθήκες.

Ο υποθανάτιος τραυματισμός αξιολογήθηκε με την χρήση επιλεκτικών και μη επιλεκτικών μέσων. Το TSAYE ήταν το μη επιλεκτικό μέσο στο οποίο όλα τα ζωντανά καλλιεργήσιμα βακτηριακά κύτταρα θα σχημάτιζαν αποικίες. Το TSAYE+NaCl χρησιμοποιήθηκε ως

επιλεκτικό μέσο. Τα υποθανάτια τραυματισμένα κύτταρα δεν σχημάτιζαν αποικίες στον επιλεκτικό παράγοντα λόγω έλλειψης ικανότητας να ανταπεξέλθουν στην ήπια καταπόνηση στην οποία υποβάλλονται από το μέσο. Για κάθε στέλεχος, φάση ανάπτυξης και μέγεθος εμβολίου, η συγκέντρωση άλατος που διαχωρίζει με ακρίβεια τα υγιή από τα τραυματισμένα κύτταρα πιθανώς διαφέρει. Οι δοκιμές εύρεσης της Μέγιστης Μη Ανασταλτικής συγκέντρωσης (MNIC), καθορίζουν την μέγιστη συγκέντρωση άλατος που δεν αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηρίων, αυτή η συγκέντρωση χρησιμοποιείται για την παρασκευή του επιλεκτικού μέσου. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε και για τα δύο στελέχη TSAYE με 5%NaCl w/v. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με ανάλυση διακύμανσης και το students *t*-test, για να ανιχνευτούν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών που εκτιμώνται στα επιλεκτικά και μη επιλεκτικά μέσα, γεγονός που υποδεικνύει τραυματισμό, καθώς και διαφορές ανάμεσα σε δείγματα που επωάζονται υπό διαφορετικές πειραματικές συνθήκες.

Η επιβίωση και ο υποθανάτιος τραυματισμός του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, διέφερε μεταξύ καταπονήσεων, μεταξύ πειραματικών συνθηκών στην ίδια καταπόνηση και μεταξύ χρονικών σημείων στο ίδιο δείγμα. Συνολικά, υποθανάτιος τραυματισμός ανιχνεύτηκε σε κάθε μεταχείριση. Ωστόσο, διαφορετικές καταπονήσεις προκάλεσαν διαφορετικά επίπεδα τραυματισμού ακόμα και σε χρονικές στιγμές που η μείωση του πληθυσμού ήταν η ίδια.

Στην μελέτη του όξινου περιβάλλοντος, το μέσο θεωρείται ως ο σημαντικότερος παράγοντας που καθορίζει τον υποθανάτιο τραυματισμό. Τα δείγματα που επώαστηκαν σε Microcosm έδειξαν μεγαλύτερο ποσοστό τραυματισμού από ότι στο Ringer στους 4°C, και ο τραυματισμός των δειγμάτων στους 4°C ήταν περισσότερος από τον τραυματισμό των αντίστοιχων κυττάρων στους 20°C. Η διαφορά μεταξύ των στελεχών οφείλονταν στην θερμοκρασία. Στην περίπτωση του BC, τα κύτταρα που διαλύθηκαν στο Microcosm παρουσίασαν μεγαλύτερο %τραυματισμό, στους 20°C. Ο τραυματισμός εξαρτήθηκε από τον χρόνο και τα βακτήρια στους 20°C τραυματίστηκαν σε περισσότερο ποσοστό από τα αντίστοιχα δείγματα που επώαστηκαν στους 4°C. Παρατηρήθηκε διαφοροποίηση μεταξύ των στελεχών η οποία αποδόθηκε στα διαφορετικά μέσα και θερμοκρασίες επώασης. Όταν τα βακτηριακά κύτταρα *L. monocytogenes* θερμάνθηκαν στους 55°C για 120 λεπτά, δεν βρέθηκαν μεταξύ των δειγμάτων σε καμία χρονική στιγμή στατιστικά σημαντικές διαφορές αναφορικά με την μείωση του πληθυσμού. Τα κύτταρα του στελέχους ScottA εμφάνισαν σημαντικά περισσότερο %τραυματισμό όταν διαλύθηκαν στο μέσο Ringer συγκριτικά με το Microcosm.

Υπό συνθήκες απουσίας θρεπτικών συστατικών, μέρος του βακτηριακού πληθυσμού στα περισσότερα δείγματα επιβίωσε για 8 εβδομάδες. Ο τραυματισμός ήταν πιο εκτεταμένος στο μέσο Microcosm συγκριτικά με το Ringer και καθορίστηκε κυρίως από την θερμοκρασία. Στους 20°C, τα κύτταρα είχαν ελάχιστο αρχικό υποθανάτιο τραυματισμό, ο οποίος αυξήθηκε όσο τα κύτταρα εκτίθενται στην καταπόνηση. Στους 4°C, ο %τραυματισμός ήταν μικρότερος και παρουσίασε αυξομειώσεις σε διαφορετικά χρονικά σημεία ενώ το μέγεθος του πληθυσμού παρέμεινε σταθερό. Παρατηρήθηκε επίσης διαφοροποίηση μεταξύ στελεχών. Όταν στο μέσο διάλυσης προστέθηκε άλας, σε συνδυασμό με έλλειψη θρεπτικών στοιχείων, ο υποθανάτιος τραυματισμός που εντοπίστηκε ήταν σημαντικά λιγότερος συγκριτικά με την

καταπόνηση λιμού. Το στέλεχος EGD-e εμφάνισε μεγαλύτερο τραυματισμό από το ScottA και η θερμοκρασία επώασης είχε επίσης ρόλο στον υποθανάτιο τραυματισμό, καθώς τα κύτταρα στους 20°C τραυματίστηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό συγκριτικά με τους 4°C. Στο μέσο Ringer προκλήθηκε μεγαλύτερος τραυματισμός από ότι στο Microcosm.

Η παρούσα μελέτη εντάσσεται και θα μπορούσε να συνεισφέρει στην γενικότερη προσπάθεια στην επιστήμη τροφίμων για την αναγνώριση και την καλύτερη κατανόηση των κινδύνων που ο υποθανάτιος τραυματισμός ενέχει για την ασφάλεια τροφίμων. Ειδικότερα στην περίπτωση του παθογόνου μικροοργανισμού τροφιμογενούς προέλευσης *Listeria monocytogenes*, η ανάγκη για σχεδιασμό αποτελεσματικών πρακτικών επεξεργασίας και απολύμανσης είναι πρωτεύουσας σημασίας.

Επιστημονική Περιοχή: Επιστήμη Τροφίμων

Λέξεις Κλειδιά: *Listeria monocytogenes*, υποθανάτιος τραυματισμός, όξινη καταπόνηση, απολυμαντικά, θερμική καταπόνηση, έλλειψη θρεπτικών στοιχείων

Abstract

Listeria (L.) monocytogenes is an ubiquitous foodborne pathogen commonly found in reservoirs such as water, soil, plantation and animals. Food processing environments, raw materials and RTE foods are easily contaminated through carriers. Listeriosis is an increasingly occurring and possibly lethal medical condition caused by *L.monocytogenes* infection.

L. monocytogenes is able to overcome and survive a wide range of conditions utilized by the food industry in order to minimally process foods and secure safety. These include high temperatures, acidic environments, addition of salts, environments where nutrition elements are absent and the use of disinfectants. All these factors are considered as stresses by the bacterial cells.

Under stress conditions, it is possible for the microbial cell to remain healthy, assuming the stress is mild. This is because of stress response mechanisms that are being activated. The cell undergoes physiological alterations that allow it to adapt to the new environment and become resistant to the particular stress among others. However, in cases when a more severe stress is applied, the cells become sublethally injured. This amounts to several cell components and metabolic pathways losing part of their functionality, depending on the mode of action of the stress. Sublethal injury is a reversible phenomenon, meaning that in case bacterial cells don't perish, but instead get injured during plant disinfection or food process, they can recover. The implications associated with the consumption of food containing injured subpopulations of *Listeria monocytogenes*, are a considerable threat to food safety.

The aim of the present study is to assess in a quantitative matter the extent of sublethal injury of *Listeria monocytogenes* cells under stress conditions associated with food processing and food processing environments. More specifically, two bacterial strains, ScottA (serotype 4b) and EGD-e (serotype 1/2a) were subjected to heat stress, acidic stress due to lactic acid, the commonly used disinfectant agent Benzalkonium Chloride (BC), starvation and starvation conditions with the addition of salt in the medium. The stress agent was dissolved in either one of two mediums, Ringer or Microcosm Water and after the initial exposure of 10^9 CFU inoculum of bacteria in mid stationary growth phase, the cells were incubated in two temperatures, 4°C or 20°C. The comparison of the sublethal injury among different experimental conditions was also an aspect of this study.

The sublethal injury was assessed by using selective and nonselective substrates. TSAYE was the nonselective medium, meaning that all alive and culturable cells would form colonies when spread to the medium. TSAYE + NaCl was chosen as the selective medium. Sublethally injured cells would not form colonies in the selective medium due to the loss of the ability to overcome the mild stress subjected to them by that medium. For every strain, growth phase and inoculum size, the concentration of NaCl that can accurately separate the healthy from the sublethally injured cells, may be different. The MNIC test determines the maximum concentration of NaCl that is not by itself inhibitory for the bacterial growth, this concentration is used for the composition of the selective media. In the case of the present study, 5%NaCl w/v was found to be the MNIC for both strains. Results were analyzed by using

analysis of variance and students *t*-test in order to detect statistically significant differences between salt concentrations within the same sample, indicating injury, as well as differences between samples under different experimental conditions.

The survival and sublethal injury of *Listeria monocytogenes* differed significantly between stresses, between conditions under the same stress and between time points within the same sample type. Overall, statistically significant sublethal injury was present during every treatment. However, different stresses caused different injury levels, even at timepoints when the population decrease was the same.

In the studies concerning acidic stress, the dilution medium is considered to be the most important factor, defining sublethal injury. Samples dissolved in Microcosm Water showed greater percentage of injury than in Ringer in 4°C and the injury of samples incubated at 4°C was considerably greater than the injury of samples incubated at 20°C. Temperature was identified as the source of strain variation. In the case of BC, cells diluted in Microcosm Water exhibited greater injury at 20°C. Sublethal injury was time-dependent and greater in the samples incubated in 20°C than those in 4°C. Strain variation was present and attributed to the different media and temperatures. When *Listeria monocytogenes* cells were heated at 55°C for 120minutes, no statistically significant difference was found between the reduction of different samples at any given timepoint. The bacteria belonging to ScottA strain exhibited a greater percentage of injury when incubated in Ringer compared to Microcosm.

Under starvation conditions, part of the cell population in most samples survived for 8 weeks. Bacteria diluted in Microcosm Water exhibited a greater percentage of sublethal injury, compared to Ringer and injury was mostly defined by temperature. At 20°C, samples had no statistically significant original injury, which increased as exposure to stress increased. At 4°C, injury was smaller and was increased and then decreased at different time points as sample population remained mostly stable. Strain variation was present. When 7% NaCl was added to the dilution medium in combination with starvation, the sublethal injury exhibited by cells was significantly smaller compared to starvation. EGD-e strain exhibited significantly greater injury than ScottA, and incubation temperature proved to be of importance, as samples incubated in 20°C were injured in a greater extend compared to samples in 4°C. The medium Ringer contained more %injured cells than Microcosm Water.

The present study is part and could contribute to the greater effort put by food science in order to identify and better understand the potential risks bacterial sublethal injury harbors for food safety. Especially in the case of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*, the need to design effective processes and disinfectant strategies, cannot be understated.

Scientific field: Food Science

Key words: *Listeria monocytogenes*, sublethal injury, acid stress, disinfectants, thermal stress, starvation

1. Εισαγωγή

1.1 Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes*

1.1.1 Ταξινόμηση και Ιστορική αναδρομή

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* είναι βακτήριο, ανήκει στο βασίλειο των Ευβακτηρίων και στο φύλλο Firmicute λόγω του ισχυρού κυτταρικού του τοιχώματος. Στον Πίνακα 1.1 παρουσιάζεται η ταξινόμηση του οργανισμού όπως είναι γνωστή σήμερα.

Τάξο	
Βασίλειο	Eubacteria
Φύλλο	Firmicutes
Κλάση	Bacilli
Τάξη	Bacillales
Οικογένεια	Listeriaceae
Γένος	<i>Listeria</i>
Είδος	<i>Listeria monocytogenes</i>

Πίνακας 1.1: Ταξινόμηση του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*.

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά από την ομάδα των Murray και Swann το 1924 στο πανεπιστήμιο του Cambridge, έπειτα από αιφνίδιους θανάτους που παρατηρήθηκαν σε εργαστηριακά ζώα (Murray *et al.*, 1926). Η ερευνητική ομάδα εξήγαγε το συμπέρασμα ότι ο μικροοργανισμός τον οποίο απομόνωσε δεν είχε χαρακτηριστεί και συνεπώς ανήκει σε νέο είδος, το οποίο ονόμασε *Bacterium monocytogenes*. Το γένος μετονομάστηκε σε *Listeria* το 1940 από τον Pirie (Pirie, 1940). Οι πρώτες επιβεβαιωμένες απομονώσεις του μικροοργανισμού από πρόβατα και ανθρώπους έλαβαν χώρα το 1929 από τον Gill και τον Nyfeldt (Farber and Peterkin, 1991). Την δεκαετία του 1970 ο μικροοργανισμός σχετίστηκε με ανθρώπινη ασθένεια και το 1983 οι Schlech *et al.* έδειξαν ότι πρόκειται για ένα τροφιμογενές παθογόνο (Schlech *et al.*, 1983). Η πρώτη καταγεγραμμένη υπόθεση λιστερίωσης αφορά έναν στρατιώτη που υπέφερε από μηνιγγίτιδα στο τέλος του Δεύτερου Παγκοσμίου Πολέμου. Μέχρι πρόσφατα το γένος *Listeria* θεωρούταν ότι περιλαμβάνει 6 είδη και 2 υποείδη, όμως τα τελευταία χρόνια ο αριθμός των ειδών έχει αυξηθεί σε 17. Από αυτά, το *Listeria monocytogenes* και το *Listeria ivanovii* είναι παθογόνα σε ανθρώπους και σε μηρυκαστικά αντίστοιχα (Radoshevich and Cossart, 2018).

1.1.2. Φυσιολογία και χαρακτηριστικά του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*

Ο μικροοργανισμός *L.monocytogenes*, είναι ένα θετικό κατά Gram βακτήριο, δηλαδή διαθέτει ένα παχύ στρώμα πεπτιδογλυκάνης (20-80nm) το οποίο σχηματίζει το κυτταρικό τοίχωμα. Είναι ραβδόμορφο βακτήριο, με διάμετρο 0,4-0,5nm και μήκος 0,5-2nm μη σπορογόνο, προαιρετικά αναερόβιο και δύναται να αναπτυχθεί σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών -0.4°C-50°C. Μεταξύ των θερμοκρασιών 20°C-25°C, παρατηρείται έντονη κινητικότητα ενώ η βέλτιστη ανάπτυξη τοποθετείται σε εύρος τιμών 30°C-37°C. Σε χαμηλές θερμοκρασίες η αύξηση γίνεται σε μειωμένους ρυθμούς συγκριτικά με υψηλότερες θερμοκρασίες (Rocourt and Cossart, 1997). Σε θερμοκρασίες κάτω από 0°C τα κύτταρα επιβιώνουν ή ξεκινούν την αδρανοποίηση ενώ με έκθεση σε θερμοκρασίες πάνω από 50°C, αδρανοποιούνται. Επιπλέον, ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* επιβιώνει σε ευρύ φάσμα τιμών pH, από 4.4 έως 9.6 (Rocourt and Cossart, 1997). Η ανάπτυξη ή επιβίωση σε χαμηλότερες τιμές pH επηρεάζεται από την θερμοκρασία επώασης, το είδος και την συγκέντρωση του οξέος. Σε τιμές χαμηλότερες του 4.3, ο μικροοργανισμός επιβιώνει αλλά δεν πολλαπλασιάζεται. Οι Rocourt και Cossart, αναφέρουν ότι με προσθήκη έως 0.1% ακετικού, κιτρικού και γαλακτικού οξέος σε τρυπτόζη (tryptose broth) αναστέλλει την αύξηση του *L.monocytogenes*, με την αναστολή να αυξάνεται όσο μειώνεται η θερμοκρασία. Οι ίδιοι παρατήρησαν ότι σε ίδιες τιμές pH, το ακετικό οξύ ήταν περισσότερο επιβλαβές από το κιτρικό και το γαλακτικό.

Αναφορικά με την Ενεργότητα Ύδατος (a_w -water activity) ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται βέλτιστα σε τιμές άνω του 0,97. Η ελάχιστη τιμή ενεργότητας ύδατος στην οποία δύναται να αναπτυχθούν τα περισσότερα στελέχη *Listeria monocytogenes* είναι 0.93 ενώ σε ορισμένα είναι το 0.90. Υπάρχουν ωστόσο και περιπτώσεις όπου κύτταρα έχουν επιβιώσει και σε τιμές a_w 0,83.

Τέλος, ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* αναπτύσσεται παρουσία χλωριούχου νατρίου (sodium chloride-NaCl) συγκέντρωσης έως και 2M (περίπου 12%w/v) και επιβιώνει σε συγκέντρωση άλατος έως 3M (περίπου 13% w/v) ενώ ο πληθυσμός δύναται να αυξηθεί σε υψηλά επίπεδα σε ενδιάμεσες συγκεντρώσεις άλατος 6.5% (Cole *et.al.*,1990). Το βακτήριο διατηρείται παρουσία άλατος για μακρά χρονικά διαστήματα ανάλογα με το μέγεθος του εμβολίου έως και 132 ημέρες, ενώ η θανάτωση αυξάνεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες (Shahamat, *et.al.*,1980).

1.1.3 Οικολογικοί θώκοι του μικροοργανισμού *L.monocytogenes*.

A. Νερό, χώμα, βλάστηση, Ζώα

Οι πρώτες μελέτες που αποδεικνύουν ότι το χώμα αποτελεί οικολογικό θώκο (ecological niche) του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* εντοπίζονται την δεκαετία του 1970 (NicAogain and O'Byrne,2016, Welshimer and Donker-Voet, 1971, Weisand Seeliger, 1975). Αργότερα, υπήρξαν μελέτες που υποστήριξαν ότι ο μικροοργανισμός δεν διαβιεί στο χώμα φυσιολογικά, αλλά εντοπίζεται εκεί έπειτα από επιμόλυνση από αποκρίσεις ζώων, υγρά απόβλητα και φυτικούς ιστούς σε αποσύνθεση (Fenlon *et.al.*,1996). Η επιβίωση στο χώμα δύναται να είναι μακροπρόθεσμη και εξαρτάται από τον τύπο του χώματος, την

διαθεσιμότητα του νερού, την θερμοκρασία και την ήδη υπάρχουσα μικροχλωρίδα, ιδιαίτερα βακτηριοφάγους και πρωτόζωα (McLaughlin et.al.,2011, NicAogain and O'Byrne,2016). Τα τελευταία βρέθηκε ότι ανταγωνίζονται το βακτήριο για θρεπτικά συστατικά, έτσι όταν το χώμα είναι φτωχό σε ανταγωνιστές, ο *Listeria monocytogenes* διαβιεί σε αυτό το περιβάλλον για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Η γεωγραφική θέση και τα καιρικά φαινόμενα έχουν επίσης σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του μικροοργανισμού στο χώμα όπως απέδειξαν οι Strawn et.al., το 2013.

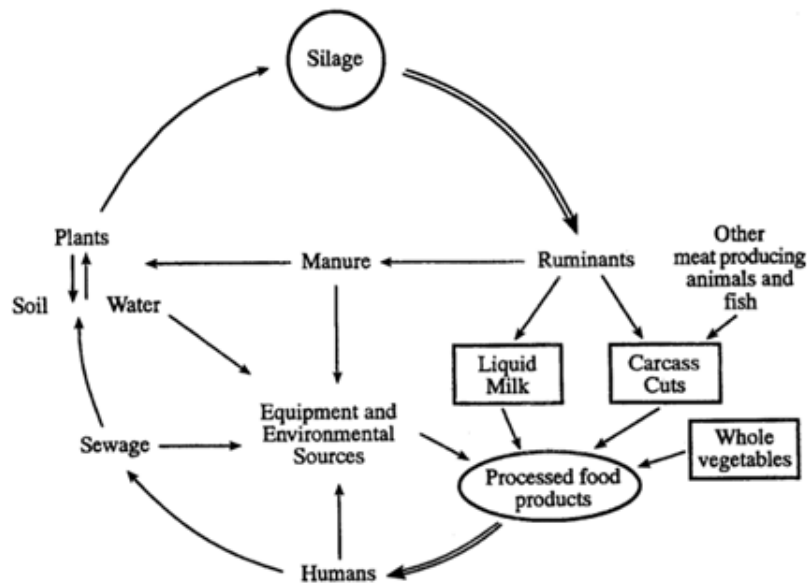
Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* διαβιεί στο νερό, ιδιαίτερα σε λίμνες, ρυάκια και ποτάμια (Lyautey et.al., 2007, NicAogain and O'Byrne,2016) και στο θαλασσινό νερό σε μικρότερο βαθμό (Colburn et.al., 1990). Αναφορικά με την τελευταία περίπτωση, γίνεται συσχετισμός της παρουσίας του μικροοργανισμού στο νερό με την επιμόλυνση ψαριών και θαλασσινών, με ορισμένες πηγές να αναφέρουν ότι το θαλασσινό νερό είναι μία σημαντική πηγή επιμόλυνσης ενώ άλλες απορρίπτουν την υπόθεση (Jemmi and Keusch, 1994). Σε κάθε περίπτωση, η επιβίωση του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* στο θαλασσινό νερό εξαρτάται από το στέλεχος, την διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, την ωσμωτική καταπόνηση, την ανταγωνιστική μικροχλωρίδα και την θερμοκρασία, με τις χαμηλότερες θερμοκρασίες να είναι ευνοϊκότερες έναντι των υψηλότερων (Smith et.al., 1994, NicAogain and O'Byrne,2016).

Το νερό που χρησιμοποιείται για άρδευση θεωρείται σήμερα μία σημαντική πηγή επιμόλυνσης του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* καθώς αυτός μεταφέρεται εύκολα από αυτό απευθείας σε τρόφιμα πριν την συγκομιδή τους (Strawn et.al., το 2013). Επιπλέον, τα φυτά δύναται να επιμολυνθούν από την χρήση κοπριάς ζώων ως λίπασμα (Fenlon et.al., 1996, Garrec et.al., 2003).

B. Χώροι Επεξεργασίας Τροφίμων

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* εισάγεται σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων μέσω πρώτων υλών, φυτικών ιστών και ωμών τροφίμων ζωικής προέλευσης μεταξύ άλλων ή μέσω υγιών φορέων και ζώων-εισβολέων τα οποία αποβάλλουν το βακτήριο. Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων καθίσταται δυνατή από την υγρασία και την παρουσία θρεπτικών στοιχείων. Ο μικροοργανισμός ανιχνεύεται συνήθως σε εξοπλισμό ο οποίος χρησιμοποιείται για την επεξεργασία των τροφίμων, αλλά και σε θέσεις με υγρασία όπως στο δάπεδο, σε αποχετεύσεις, και περιοχές με συσσωρευμένο στάσιμο νερό (Doyle and Beuchat, 2007).

Το βακτήριο *Listeria monocytogenes* δύναται να επιβιώσει σε αυτά τα περιβάλλοντα για εκτεταμένο χρονικό διάστημα, ενώ είναι δύσκολο να εντοπιστεί ακριβώς η πηγή της επιμόλυνσης. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου το ίδιο στέλεχος ανιχνεύεται ξανά και ξανά στον χώρο στην πάροδο του χρόνου, τα κύτταρα είναι δηλαδή «εμμένοντα» (persisters, το φαινόμενο είναι γνωστό ως persistence). Ωστόσο είναι δύσκολο να βεβαιώσουμε τον λόγο για τον οποίο το στέλεχος ανιχνεύεται, δηλαδή αν πρόκειται όντως για εμμένοντα κύτταρα (persisters) ή αν το στέλεχος θανατώθηκε με την διαδικασία απολύμανσης που χρησιμοποιείται και ακολούθησε εκ νέου επιμόλυνση (NicAogain and O'Byrne,2016).



Εικόνα 1.1: Πιθανές οδοί επιμόλυνσης του *L.monocytogenes*. Οι κύκλοι και τα οβάλ σχήματα δείχνουν τις περιοχές με αυξημένο κίνδυνο πολλαπλασιασμού *L.monocytogenes*. Τα κουτιά καταδεικνύουν τα μέρη από όπου άμεση κατανάλωση ελάχιστα επεξεργασμένων προϊόντων (όπως ολόκληρα φρέσκα λαχανικά, μαγειρεμένα κομμάτια κρέατος και ψαριών και αποτελεσματικά παστεριωμένου γάλακτος) έχει μικρό κίνδυνο. Τα διπλά βέλη σημαίνουν κίνδυνο για τον καταναλωτή. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers, Third Edition (p484), Fenlon, D. R. 1999.

Γ Τρόφιμα

Ο μικροοργανισμός *L.monocytogenes* μπορεί να αναπτυχθεί σε πληθώρα επεξεργασμένων και μη επεξεργασμένων τροφίμων όπως γάλα και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα, και ιδιαίτερα τυριά, κοτόπουλο, μοσχάρι, λουκάνικα, αυγά, ψάρια και λαχανικά. Επειδή ο μικροοργανισμός δύναται να επιβιώσει έπειτα από έκθεση σε θερμοκρασία <math><60^{\circ}\text{C}</math>, αλλά είναι σχετικά ευαίσθητος σε υψηλότερες θερμοκρασίες, ακόμα και αν η έκθεση σε αυτές διαρκέσει ελάχιστο χρονικό διάστημα, τα τρόφιμα τα οποία καταναλώνονται χωρίς περαιτέρω θερμική επεξεργασία (ready-to-eat foods-RTE), είναι η κύρια πηγή λοιμώξεων από *L.monocytogenes*. (Moretro *et.al.*,2017, Lado and Yousef,2007). Τέτοια τρόφιμα τυπικά τοποθετούνται στην συντήρηση προσφέροντας έτσι κατάλληλο περιβάλλον για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του *Listeria monocytogenes* κατά την παραγωγή, την ωρίμαση, την μεταφορά και την αποθήκευση. Χαρακτηριστικά παραδείγματα έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων τα οποία έχουν σχετιστεί με κρούσματα λιστερίωσης, είναι το μη παστεριωμένο γάλα, ορισμένα τυριά, το ζαμπόν, τα λουκάνικα, ορισμένα θαλασσινά, το καπνιστό ψάρι και τα φρέσκα λαχανικά (Doyle and Beuchat, 2007).

Αναφορικά με τον έλεγχο για την παρουσία *Listeria monocytogenes* στα τρόφιμα, ο ευρωπαϊκός κανονισμός 2073/05 υποχρεώνει τους υπεύθυνους επιχειρήσεων τροφίμων οι οποίες παράγουν τρόφιμα που υποστηρίζουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού να διεξάγουν ελέγχους και να συμμορφώνονται με τα κριτήρια της νομοθεσίας σε όλο το

διάστημα διατήρησης του τροφίμου (shelf life). Ο κανονισμός δηλώνει ως επιτρεπόμενο πληθυσμό ≤ 100 CFU/g σε έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα στα οποία ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται για όσο χρόνο διατίθενται στην αγορά και απουσία του μικροβίου σε 25g για έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα που προορίζονται για νεογνά και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20071227&from=EN>).

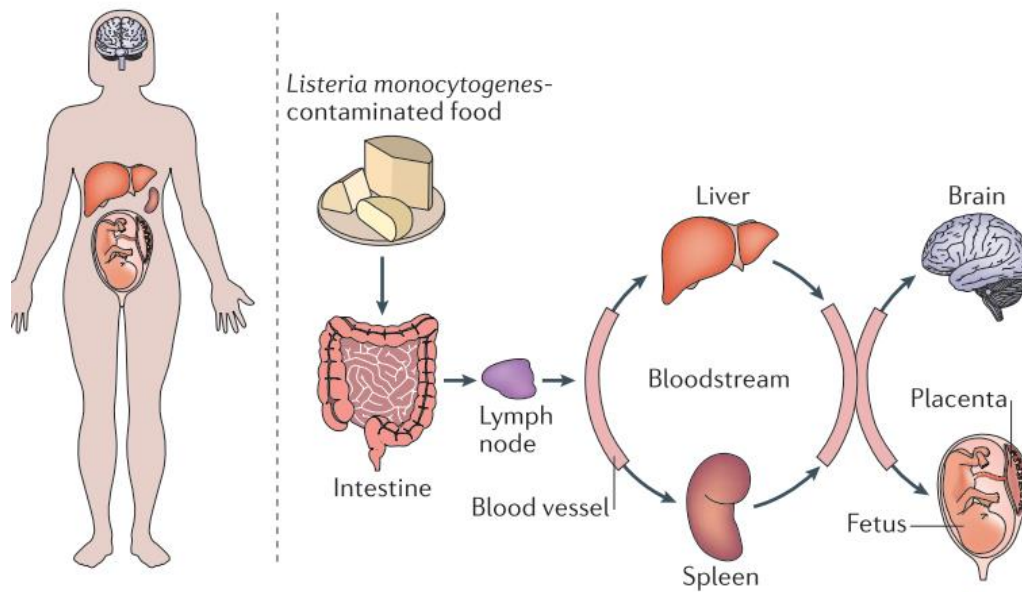
1.1.4. Λιστερίωση

Η λιστερίωση είναι η πάθηση η οποία προκαλείται από την δράση του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*. Θεωρείται από τις σημαντικότερες ασθένειες που σχετίζονται με την κατανάλωση τροφίμων. Διακρίνεται σε μη επεμβατική (non invasive) και σε επεμβατική (invasive) (Radoshevich and Cossart, 2018).

Η κλινική λιστερίωση παρατηρείται κυρίως σε ομάδες υψηλού κινδύνου, συγκεκριμένα σε άτομα προχωρημένης ηλικίας, ανοσοκατεσταλμένα άτομα, έγκυες γυναίκες, έμβρυα και νεογνά. Σε υγιή άτομα η λοίμωξη συνήθως προκαλεί γαστρεντερίτιδα, χωρίς κάποια περεταίρω συμπτώματα. Αντίθετα, στις ομάδες υψηλού κινδύνου, η εκδήλωση της ασθένειας δύναται να περιλαμβάνει σήψη, μηνιγγίτιδα ή εγκεφαλίτιδα, οδηγώντας σε χρόνια επιβάρυνση της υγείας του ασθενούς ή και σε θάνατο. Η λοίμωξη του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος συνήθως περιλαμβάνει και πρόδρομα συμπτώματα όπως πονοκέφαλος, πυρετός, εμετός και δυσφορία. Λοίμωξη κατά την εγκυμοσύνη μπορεί να οδηγήσει σε αποβολή ή θνησιγένεια (de Noordhout *et.al.*, 2014). Αν και λιγότερο συχνή συγκριτικά με άλλες ασθένειες που προκαλούνται από παθογόνους μικροοργανισμούς των τροφίμων, η λιστερίωση έχει υψηλό δείκτη θνησιμότητας, 20%-30% (de Noordhout *et al.*, 2014, Radoshevich and Cossart, 2018).

Στάδια της λοίμωξης

Κατά την πέψη μολυσμένου τροφίμου από τον ανθρώπινο οργανισμό, ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* συναντά το εντερικό επιθήλιο (intestinal epithelium), διασχίζει τον εντερικό επιθηλιακό φραγμό (intestinal epithelial barrier) και περνά στην *lamina propria*, μία λεπτή στιβάδα συνδετικού ιστού, πλούσια σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και ιδιαίτερα λεμφοκύτταρα αλλά και μακροφάγα, ηωσινόφιλα, λευκοκύτταρα και μαστικά κύτταρα (Cossart, 2011). Από εκεί ο μικροοργανισμός διαχέεται μέσω της λέμφου και του αίματος και βρίσκει τα όργανα-στόχους, το ήπαρ και την σπλήνα. Μπορεί στην συνέχεια να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (blood-brain barrier) ή τον εμβρυοπλάκουντικό φραγμό στις εγκύους (fetoplacental barrier) (Cossart, 2011).



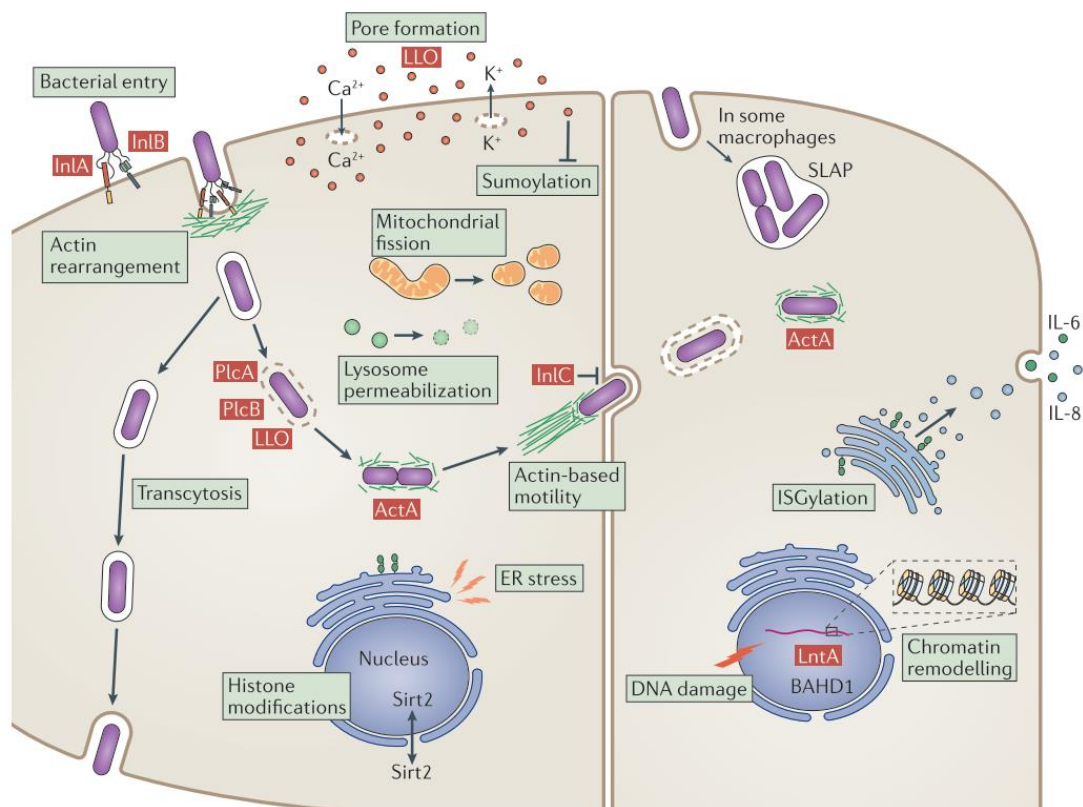
Εικόνα 1.2: Η πορεία του *L.monocytogenes* στον οργανισμό (Radoshevich and Cossart, 2018).

Ο μικροοργανισμός δύναται να εισέλθει σε φαγοκύτταρα μέσω της διαδικασίας της φαγοκύτωσης ή σε μη φαγοκυτταρικά κύτταρα, όπως τα επιθηλιακά με τον μηχανισμό ενδοκύτωσης υποβοηθούμενης από υποδοχέα (receptor mediated endocytosis). Ο μηχανισμός περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες ιντερναλίνες (Internalins), με πιο σημαντικές σε αυτήν την περίπτωση τις Internalin A και Internalin B (InIA, InIB) οι οποίες προσδένονται στους υποδοχείς E-cadherin και Met της κυτταρικής μεμβράνης των ευκαριωτικών κυττάρων (Cossart and Helenius, 2014).

Μετά την είσοδο στο κύτταρο, ο *L.monocytogenes* εισβάλλει στο κενόσωμα (vacuole), προκαλεί πυρήνωση και πολυμερισμό της ακτίνης, που οδηγεί στην αλλαγή της διάταξης του κυτταροσκελετού. Κατόπιν το βακτήριο διασχίζει την μεμβράνη του κενόσωματος με την βοήθεια της πρωτεΐνης αιμολυσίνη O (listeriolysin O-LLO) και δύο φωσφολιπασών, την φωσφολιπάση A και την φωσφολιπάση B (phospholipase A-PlcA, PlcB) και μεταβαίνει στο κυτταρόπλασμα, από όπου δύναται να επηρεάσει φυσιολογικές διαδικασίες και μηχανισμούς του κυττάρου. Ενδιαφέρουσα είναι και η συμβολή των λιποπρωτεασών, οι οποίες υπερεκκρίνονται από τον μικροοργανισμό και προωθούν την έξοδο από το κενόσωμα (Xagarath *et.al.*, 2015). Στα φαγοκύτταρα, η έξοδος από το κενόσωμα περιλαμβάνει εκτομή φάγων (phage excision), δηλαδή την απομάκρυνση DNA βακτηριοφάγου ο οποίος είχε εισαχθεί προηγουμένως στο βακτηριακό γονιδίωμα (Rabinovich *et.al.*, 2012). Το βακτήριο δύναται να προκαλέσει επιγενετικές αλλαγές και να μεταβεί από κύτταρο σε κύτταρο χρησιμοποιώντας τον μηχανισμό κινητικότητας βάσει ακτίνης (actin based motility) (Lambrechts *et.al.*, 2008).

Η αιμολυσίνη O (LLO), έχει πληθώρα καταγεγραμμένων λειτουργιών, που περιλαμβάνουν τον σχηματισμό πόρων με σκοπό την διάρρηξη του φαγοσώματος και την αλλαγή στην λειτουργία και την μορφολογία των μιτοχονδρίων, τα οποία γίνονται μικρά και στρογγυλά με έντονο το φαινόμενο της μιτοχονδριακής σχάσης (mitochondrial fission), μία εναλλακτική μορφή μιτοχονδριακής διαίρεσης, η οποία όμως λαμβάνει χώρα μη κανονικά, ενώ δεν είναι

ακόμα γνωστός ο μηχανισμός με τον οποίο τα βακτήρια ωφελούνται από αυτό (Radoshevich and Cossart, 2018). Η λοίμωξη, πιθανότατα λόγω της παραγωγής LLO, επηρεάζει και το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), καθώς του προκαλεί καταπόνηση. Σε περιπτώσεις καταπόνησης του δικτύου, όταν δηλαδή η ανάγκη για αναδίπλωση πρωτεϊνών ξεπερνά την δυνατότητα του δικτύου την δεδομένη στιγμή, ενεργοποιείται μηχανισμός ανάδρασης (UPR-unfolded protein response), ο οποίος μειώνει την μετάφραση πρωτεϊνών και εμποδίζει ταυτόχρονα την είσοδό τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο ενώ ταυτόχρονα υπερεκφράζονται πρωτεΐνες που το επεκτείνουν. Τέλος, η LLO συμβάλει με άγνωστο ακόμα μηχανισμό στην διάρρηξη της μεμβράνης των λυσοσωμάτων (Radoshevich and Cossart, 2018).



Εικόνα 1.3: Η δράση του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* μέσα στο κύτταρο (Radoshevich and Cossart, 2018).

1.1.5 Η Λιστερίωση τα τελευταία χρόνια

Από τις αρχές της δεκαετίας του 2010 παρατηρείται αύξηση των μεμονωμένων περιστατικών και των ξεσπασμάτων λιστερίωσης. Στην Ευρώπη, τα στοιχεία της EFSA αναφέρουν ότι το 2013 καταγράφηκαν 1763 κρούσματα στις χώρες-μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης (αύξηση 8,6% σε σχέση με το 2012), με 0,44 κρούσματα ανά 100.000 πληθυσμού και δείκτη θνησιμότητας 15,6%. Η ανοδική τάση των κρουσμάτων συνεχίστηκε το 2014, με 2.161 υποθέσεις (0,52 υποθέσεις ανά 100.000 πληθυσμό) και αύξηση 16% σε σχέση με το 2013. Το 2015 καταγράφηκαν 2.200 υποθέσεις και 270 θάνατοι από λιστερίωση, ποσοστά που ξεπέρασαν κάθε προηγούμενο. Το 2016, με 2,536 κρούσματα, η λιστερίωση ήταν η

σοβαρότερη ζωνόσος της Ευρώπης, με βάση τα ποσοστά νοσηλείας και θνησιμότητας. (EFSA 2013, EFSA 2014, EFSA 2015, EFSA 2016)

Table 2: Reported hospitalisation and case fatality rates due to zoonoses in confirmed human cases in the EU, 2016

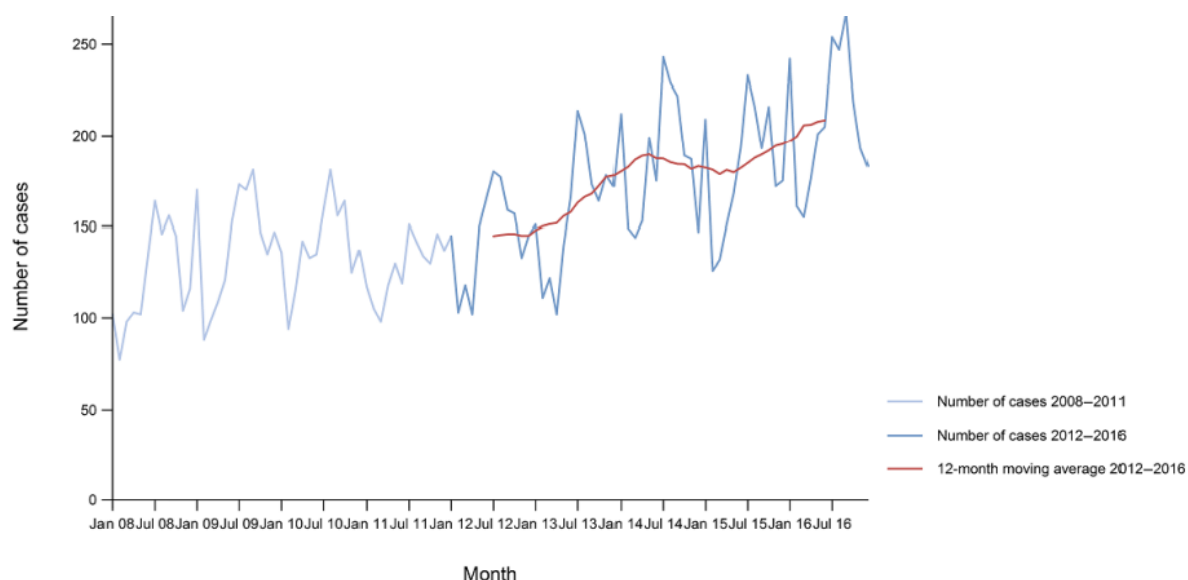
Disease	Number of confirmed human cases ^(a)	Hospitalisation				Deaths			
		Status available (%)	Number of reporting MSs ^(b)	Reported hospitalised cases	Proportion hospitalised (%)	Outcome available (%)	Number of reporting MSs ^(b)	Reported deaths	Case fatality (%)
Campylobacteriosis	246,307	27.4	17	19,265	28.5	72.6	16	62	0.03
Salmonellosis	94,530	33.5	14	12,182	38.4	55.2	16	128	0.25
Yersiniosis	6,861	24.1	14	521	31.5	63.5	15	5	0.11
STEC infections	6,378	42.6	18	940	34.6	58.9	20	10	0.27
Listeriosis	2,536	38.8	18	962	97.7	60.1	20	247	16.2
Q-fever	1,057	NA ^(c)	NA	NA	NA	54.3	15	3	0.30
Tularaemia	1,056	12.3	11	130	54.6	15.8	12	0	0.0
Echinococcosis	772	26.2	14	119	58.9	25.4	13	1	0.51
Brucellosis	516	39.7	12	146	71.2	26.0	12	1	0.75
West Nile fever ^(a)	240	65.1	7	147	93.6	99.2	9	28	11.7
Trichinellosis	101	45.5	7	30	65.2	50.5	8	0	0.0
Rabies	0	NA ^(c)	NA	NA	NA	0.0	0	0	0.0

MS: Member State; STEC: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*.

(a): Exception: West Nile fever in which the total number of cases was included.

(b): Not all countries observed cases for all diseases.

(c): NA: Not applicable as information is not collected for this disease.



Source(s): Austria, Belgium, Cyprus, the Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Iceland, Ireland, Italy, Latvia, Lithuania, Malta, the Netherlands, Norway, Poland, Romania, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden and the United Kingdom. Bulgaria, Croatia, Luxembourg and Portugal did not report data to the level of detail required for the analysis.

Εικόνα1.4: Αριθμός κρουσμάτων και ποσοστό θνησιμότητας από ζωνόσους στην Ευρωπαϊκή Ένωση το 2016. Στο κόκκινο κουτί καταδεικνύεται η λιστερίωση (σχήμα από EFSA zoonoses report, 2016)

Εικόνα1.5: Αριθμός κρουσμάτων λιστερίωσης στην Ευρωπαϊκή Ένωση στην περίοδο 2008-2016 (EFSA zoonoses report 2016)

Οι Allerberger και Wagner αναφέρουν ως αίτια αύξησης των κρουσμάτων λιστερίωσης την δημογραφική μεταβολή, την αύξηση του ανοσοκατεσταλμένου πληθυσμού και την εκτεταμένη χρήση ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων. Επιπλέον, ο σύγχρονος τρόπος ζωής

των καταναλωτών, τους ωθεί στην χρήση έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων, στα οποία αναπτύσσεται ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes*. Ένα ζητούμενο στην τεχνολογία τροφίμων είναι η παραγωγή προϊόντων με μεγαλύτερο χρόνο ζωής, σε αυτές τις περιπτώσεις ο μικροοργανισμός έχει περισσότερο χρόνο να αναπτυχθεί ακόμα και σε τρόφιμα στα οποία τυπικά δεν συναντάται. Ειδικά εάν πριν την κατανάλωση δεν προηγηθεί μαγείρεμα, μία διαδικασία που θα θανάτωνε φυσιολογικά τα παθογόνα βακτήρια, ο καταναλωτής έχει αυξημένες πιθανότητες να νοσήσει. Άλλες μελέτες αναφέρουν ότι η μείωση της χρήσης άλατος ως συντηρητικό στα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, συνεισφέρει στην αύξηση κρουσμάτων λιστερίωσης. (Allerberger & Wagner, 2010).

1.1.6. Κρούσματα λιστερίωσης την δεκαετία 2010-2018

Τα σημαντικότερα κρούσματα λιστερίωσης όπως αναφέρει το CDC (Centers for Disease Control and Prevention- Κέντρο Ελέγχου και Αποτροπής Νοσημάτων), προκλήθηκαν από πεπόνια το 2011, τυρί ρικόττα το 2012, τυρί το 2013, τυριά, γαλακτοκομικά, ρίζες φασολιών και καραμελωμένα μήλα το 2014, μαλακά τυριά και παγωτό το 2015, κατεψυγμένα λαχανικά, μη παστεριωμένο γάλα και συσκευασμένες σαλάτες το 2016 και μαλακό μη παστεριωμένο τυρί το 2017. Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά ορισμένες υποθέσεις (<https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html>).

- Κομμένο σέλινο, 2010: Το 2010, υπήρξαν 10 υποθέσεις λιστερίωσης σε νοσοκομεία στο Texas των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (ΑΠΑ,USA), με 5 από αυτές να καταλήγουν σε θάνατο. Η επιμόλυνση με *L. monocytogenes* προέκυψε στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας του σέλινου, όπως αποκαλύφθηκε αργότερα (Gaul *et.al.*,2013).
- Πεπόνια,2011: 147 περιστατικά με 33 θανάτους σημειώθηκαν σε διάφορες πολιτείες των ΗΠΑ το 2011,λόγω κατανάλωσης επιμολυσμένων πεπονιών. Θεωρείται το πλέον θανατηφόρο ξέσπασμα ασθένειας που σχετίζεται με τρόφιμο στην Αμερική (CDC,2012, Laksanalamai *et.al.*, 2012)
- Καραμελωμένα μήλα, 2015: Το 2015 σημειώθηκαν 35 κρούσματα λιστερίωσης τα οποία συνδέθηκαν με κατανάλωση συσκευασμένων καραμελωμένων μήλων από δύο εταιρίες. Συνολικά 35 άνθρωποι νόσησαν σε 12 πολιτείες των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής από τους οποίους 34 νοσηλεύτηκαν και 7 απεβίωσαν. (CDC,2015).
- Προϊόντα κρέατος, 2018: Η Νότια Αφρική ειδοποίησε στις 6 Δεκεμβρίου 2017 τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO- world health organization) για επιδημία λιστερίωσης, λόγω αυξημένων κρουσμάτων που παρατηρούνταν στην χώρα από τις αρχές του έτους. Ως τις 22 του ίδιου μήνα, 550 άνθρωποι είχαν νοσήσει με 60 να έχουν χάσει την ζωή τους (World Health Organization, 2018). Τον Μάρτιο του 2018 εντοπίστηκε η πηγή της λιστερίωσης- έτοιμο προς κατανάλωση προϊόν κρέατος. Έως τον Μάιο του 2018, υπήρχαν 1024 επιβεβαιωμένα κρούσματα με το ποσοστό θνησιμότητας να φτάνει το 28%.

1.2 Η έννοια της καταπόνησης

Στον όρο "καταπόνηση" (stress) μπορεί να αποδοθεί πληθώρα ερμηνειών λόγω της χρήσης της σε ένα ευρύ φάσμα επιστημών. Στην μικροβιολογία τροφίμων ωστόσο, χαρακτηρίζεται ως ο οποιοσδήποτε παράγοντας ο οποίος δρα ανασταλτικά στην μικροβιακή επιβίωση και ανάπτυξη (Yousef and Courtney, 2003). Ο όρος τα τελευταία χρόνια τείνει να χρησιμοποιείται δίνοντας έμφαση στην επίδραση του παράγοντα στην συμπεριφορά του κυττάρου και όχι τόσο στην φυσιολογία του, καθώς φυσιολογικές μετατροπές λόγω καταπόνησης συχνά μελετώνται υπό το πρίσμα του τραυματισμού (Hurst, 1976, Wesche et al., 2009). Η καταπόνηση μπορεί να εφαρμόζεται σταδιακά ή απότομα, σε αυτήν την περίπτωση γίνεται λόγος για σοκ (shock).

Είναι σαφές ότι δεν έχουν όλες οι καταπονήσεις το ίδιο αποτέλεσμα. Ανάλογα με το είδος της καταπόνησης, την ένταση, και το χρονικό διάστημα έκθεσης του μικροβιακού πληθυσμού, οι καταπονήσεις διαχωρίζονται σε ήπιες (mild) ή υποθανάτιες, ενδιάμεσες (moderate), δριμείς (severe) και εν συνεχεία θανατηφόρες (lethal) (Yousef and Courtney, 2003).

- Οι ήπιες καταπονήσεις είναι υποθανάτιες (sublethal), δηλαδή δεν θανατώνουν τα κύτταρα, αναστέλλουν όμως τον ρυθμό αύξησης ή/ και την αύξηση. Τα κύτταρα είναι σε θέση να ανταπεξέλθουν χάρη στην αρμοστικότητα τους. Η αρμοστική απόκριση (adaptive response) και οι φυσιολογικές αλλαγές οδηγούν συχνά σε ανοχή (tolerance) του μικροοργανισμού στην ίδια ή και σε άλλες καταπονήσεις.
- Οι ενδιάμεσες καταπονήσεις εμποδίζουν την αύξηση και προκαλούν ως ένα βαθμό θανάτωση κυττάρων. Με εφαρμογή ενδιάμεσης έντασης καταπόνησης, δύναται να προκληθεί η εμφάνιση υποπληθυσμών στον αρχικό μικροβιακό πληθυσμό. Αυτοί περιλαμβάνουν υγιή, τραυματισμένα και νεκρά κύτταρα. Δημιουργείται με αυτόν τον τρόπο ένα κλινές τραυματισμού το οποίο περιλαμβάνει τα υγιή, τα ήπια έως σοβαρά τραυματισμένα και τα νεκρά κύτταρα.
- Η έντονη καταπόνηση έχει ως αποτέλεσμα την θανάτωση της πλειοψηφίας ή όλου του μικροβιακού πληθυσμού που εκτίθεται σε αυτήν. Ένας πληθυσμός κυττάρων ωστόσο δεν είναι ομοιογενής, έτσι με εφαρμογή έντονης ή και θανατηφόρας καταπόνησης, ορισμένα κύτταρα δύναται να επιβιώσουν λόγω γονιδιακών αποκρίσεων και μεταλλαγών. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να εμφανιστεί ένας νέος, ανθεκτικός στην καταπόνηση πληθυσμός.

Από τα παραπάνω γίνεται σαφές γιατί πολλές μεταχειρίσεις στην επεξεργασία τροφίμων είναι στην ουσία τους καταπονήσεις. Οι καταπονήσεις οι οποίες ασκούνται στους μικροοργανισμούς των τροφίμων εντάσσονται συνήθως σε κάποιες από τις παρακάτω κατηγορίες:

- Μεταχειρίσεις που επιδρούν στην φυσιολογία του μικροοργανισμού, όπως αυξημένη θερμοκρασία, ωσμωτικό σοκ και ακτινοβολία μεταξύ άλλων.
- Προσθήκη χημικών παραγόντων όπως οξέα.
- Προσθήκη βιολογικών παραγόντων όπως μεταβολίτες και άλλους ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς.

1.2.1 Επίδραση των καταπονήσεων στην φυσιολογία των μικροοργανισμών

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* βρίσκεται φυσιολογικά σε μεγάλο εύρος οικολογικών θώκων ενώ χαρακτηριστική είναι η ικανότητα του είδους να αντιλαμβάνεται και να αποκρίνεται σε παράγοντες καταπόνησης.

Οι μικροοργανισμοί των τροφίμων έρχονται αντιμέτωποι με ποικίλους παράγοντες καταπόνησης κατά την παραγωγή, την επεξεργασία, την αποθήκευση και το μαγείρεμα του προϊόντος. Στις μέρες μας, η βιομηχανία τροφίμων τείνει να εφαρμόζει πολλαπλές ήπιες μεταχειρίσεις έναντι μίας έντονης, τεχνική γνωστή και ως τεχνολογία εμποδίων (hurdle technology) (Leistner, 2000). Συνεπώς οι μικροοργανισμοί καλούνται να ανταπεξέλθουν σε πολλαπλές καταπονήσεις ταυτόχρονα.

Κάτω από συνθήκες καταπόνησης προκαλούνται βλάβες σε κυτταρικές δομές, όπως το κυτταρικό τοίχωμα, η κυτταρική μεμβράνη, οι πρωτεΐνες, το RNA και το DNA. Η βλάβη εξαρτάται από την φύση και την ένταση της καταπόνησης (Begley and Hill, 2015). Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί των τροφίμων ωστόσο, έχουν αναπτύξει μηχανισμούς με τους οποίους αντιλαμβάνονται αλλαγές στο περιβάλλον τους και ανταποκρίνονται με τρόπο που οδηγεί στην επιβίωσή τους. Σε αδρές γραμμές, παρουσία παράγοντα καταπόνησης, αλλάζει η έκφραση ομάδων γονιδίων, τα οποία βρίσκονται συνήθως υπό τον έλεγχο κοινών ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Το αποτέλεσμα είναι η συσσώρευση πρωτεϊνών που εμποδίζουν τον παράγοντα από το να εισέλθει στο κύτταρο ή τον απομακρύνουν, επιδιορθώνουν βλάβες και διατηρούν την ομοιόσταση των κυττάρων (Chung et.al., 2006, Begley and Hill, 2015). Παρατηρείται ότι οργανισμοί που επιβιώνουν σε ήπια έκθεση σε παράγοντα καταπόνησης δύναται να επιβιώσουν και όταν γίνεται μεταχείριση με τον ίδιο παράγοντα σε επίπεδα που φυσιολογικά είναι θανατηφόρα. Αυτό το φαινόμενο καλείται προσαρμογή στο στρες (stress adaptation) (Yousef & Courtney 2003). Η προσαρμογή είναι ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία της φυσικής επιλογής, καθώς αυξάνει την αρμοστικότητα (fitness) και την επιβίωση των οργανισμών. Ακόμα, παρατηρείται ότι ανοχή (tolerance) σε μία καταπόνηση μπορεί να επιφέρει προστασία του οργανισμού έναντι άλλου στρες, φαινόμενο γνωστό ως διασταυρούμενη προσαρμογή (cross adaptation) (Begley and Hill, 2015).

1.3 Η έννοια του τραυματισμού

Με τον όρο "τραυματισμός", ορίζεται η επίδραση μίας ή περισσότερων υποθανάτιων μεταχειρίσεων σε έναν μικροοργανισμό. Ένας υποθανάτιος τραυματισμός είναι λοιπόν το αποτέλεσμα της δράσης μίας καταπόνησης, η οποία βλάπτει, ωστόσο δεν θανατώνει το κύτταρο. Οι Yousef και Courtney περιγράφουν τον τραυματισμό ως «βλάβες σε συστατικά του κυττάρου οι οποίες εμποδίζουν την ικανότητα των μικροοργανισμών να πολλαπλασιαστούν ή ευαισθητοποιούν τα κύτταρα σε παράγοντες καταπόνησης» (Yousef and Courtney, 2003). Οι όροι «καταπόνηση» και «τραυματισμός» συχνά χρησιμοποιούνται εναλλάξ στην βιβλιογραφία, αναφερόμενοι στην ίδια κατάσταση, με απλά λόγια όμως, η καταπόνηση είναι η αιτία που οδηγεί στον τραυματισμό, το αποτέλεσμα.

Ο υποθανάτιος τραυματισμός είναι αναστρέψιμο φαινόμενο, ένας αριθμός τραυματισμένων κυττάρων δύναται να ανακάμψουν όταν οι συνθήκες γίνουν ευνοϊκές. Αυτό αποτελεί δυνητικό κίνδυνο από άποψη ασφάλειας για τη βιομηχανία τροφίμων, καθώς

δύναται να υποτιμηθεί το μικροβιακό φορτίο σε ένα τρόφιμο και να διατεθεί προς κατανάλωση. Υποθανάτια τραυματισμένα κύτταρα ανακάμπτουν με τον χρόνο χρησιμοποιώντας τα θρεπτικά συστατικά του τροφίμου πιθανώς βλέποντας τον καταναλωτή. Για αυτόν τον λόγο, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι και θρεπτικά υποστρώματα για να ανιχνευτούν τυχόν τραυματισμένοι παθογόνοι μικροοργανισμοί (Busch and Donnelly 1992).

Μια γενική διάκριση του τραυματισμού είναι σε δομικό και μεταβολικό, ωστόσο πλέον οι δύο κατηγορίες θεωρούνται οι δύο όψεις του ίδιου νομίσματος, με την μία να είναι επέκταση της άλλης (Hurst, 1984, Wesche *et.al.*, 2009). Ο τραυματισμός μπορεί να εκδηλωθεί με πολλούς τρόπους, ουσιαστικά όμως, σε όλους χάνεται η ικανότητα ζωντανών κυττάρων να σχηματίσουν ορατές αποικίες σε θρεπτικά υποστρώματα (Hurst *et.al.*, 1977). Τα θρεπτικά μέσα τα οποία στα οποία υγιή κύτταρα πολλαπλασιάζονται, δεν επαρκούν στην περίπτωση των τραυματισμένων κυττάρων. Αυτό οφείλεται στο ότι δομές του κυττάρου, όπως το κυτταρικό τοίχωμα, έχουν τραυματιστεί, ενώ στην περίπτωση μεταβολικού τραυματισμού, ο οποίος είναι πιο εκτεταμένος, επηρεάζεται η λειτουργία περισσότερων μηχανισμών του κυττάρου. Για αυτόν τον λόγο ο τραυματισμός των κυττάρων αξιολογείται με επιλεκτικά θρεπτικά μέσα. Η διαφορά των αποικιών ανάμεσα στα πιάτα με γενικό υπόστρωμα και σε πιάτα με επιλεκτικό, χρησιμοποιείται για να βρεθεί το ποσοστό των τραυματισμένων κυττάρων σε έναν πληθυσμό, όπως θα αναφερθεί παρακάτω (Wesche *et.al.*, 2009).

Διαφορετικοί παράγοντες καταπόνησης επηρεάζουν την δομή και την λειτουργία των κυττάρων με διαφορετικό τρόπο, ανάλογα με το σημείο του κυττάρου στο οποίο δρουν. Τα συστατικά του κυττάρου στα οποία προκύπτει ο τραυματισμός περιλαμβάνουν συνήθως το κυτταρικό τοίχωμα, την κυτταρική μεμβράνη, η οποία σύμφωνα με τον Hurst επηρεάζεται συχνότερα, τα ριβοσώματα, το DNA, το RNA και ορισμένα ένζυμα (Wu, 2008, Hurst, 1977).

Βλάβη στο κυτταρικό τοίχωμα

Στα θετικά κατά Gram βακτήρια, στα οποία περιλαμβάνεται ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* πιθανότατα οι βλάβες στο κυτταρικό τοίχωμα να μην είναι τόσο σημαντικές, όσο στην περίπτωση αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Αυτό οφείλεται στην δράση της πενικιλίνης ή της κυκλοσερίνης (Hurst, 1977). Ωστόσο, στα περισσότερα τραυματισμένα κύτταρα, εντοπίζονται βλάβες στους φραγμούς της διαπερατότητας, και αυτό ακριβώς τα καθιστά ευαίσθητα σε επιλεκτικούς παράγοντες (Wu, 2008). Ο τραυματισμός δύναται να προκαλέσει διαρροή συστατικών των κυττάρων όπως Mg^{2+} , K^+ , αμινοξέα, νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες. Η απώλεια σημαντικών συστατικών οδηγεί στην αναστολή της κυτταρικής αύξησης (Busta, 1976). Διαταραχή στην διαπερατότητα μεμβρανών, παρατηρείται συχνά σε χαμηλότερες θερμοκρασίες επειδή σε αυτές τις περιπτώσεις μειώνεται η ρευστότητα της μεμβράνης. Επιπλέον, η θέρμανση, η ψύξη, η ξήρανση και η ακτινοβολία, δημιουργούν πόρους στην εξωτερική μεμβράνη (Wesche *et.al.*, 2009).

Βλάβη σε πρωτεΐνες και ένζυμα

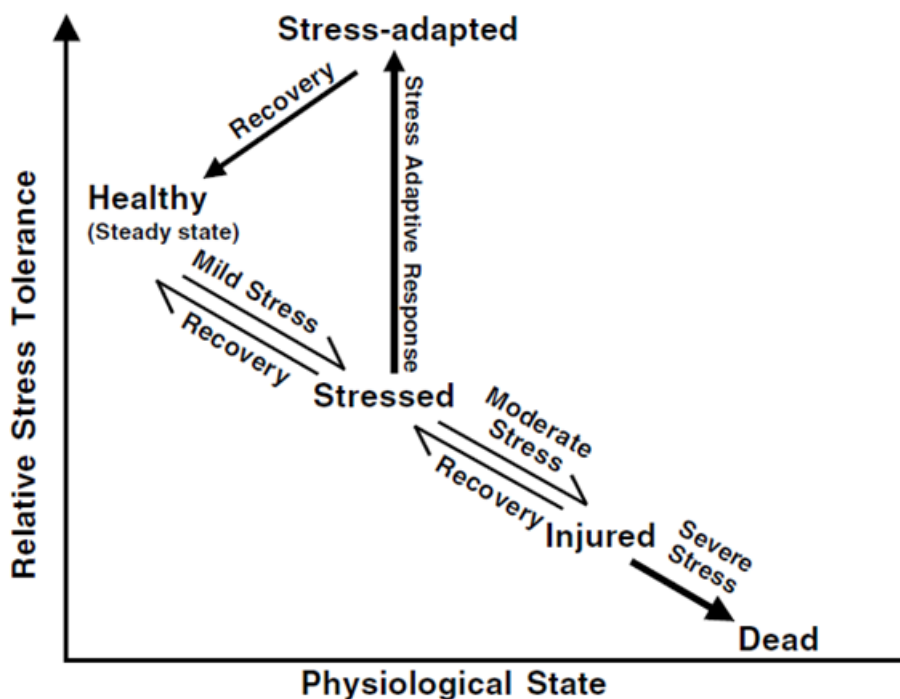
Η θέρμανση είναι η καταπόνηση που συσχετίζεται συχνότερα με την απενεργοποίηση ενζύμων και την διατάραξη της ενεργούς μεταφοράς κατιόντων, σακχάρων και αμινοξέων (Wesche *et.al.*, 2009).

Βλάβη στα ριβοσώματα και το RNA

Η αποδιάταξη των ριβοσωμάτων και η καταστροφή του rRNA συνδέεται με την θερμική επεξεργασία επειδή τα συστατικά αυτά δρουν ως αισθητήρες για την ενεργοποίηση της απόκρισης σε θερμικό σοκ. Ο λοιμός είναι ακόμα ένας παράγοντας, ιδιαίτερα αν παρατηρείται ταυτόχρονα έλλειψη Mg^{2+} (Mackey, 2000)

Βλάβη στο DNA

Βλάβη στο DNA έχει παρατηρηθεί σε κύτταρα που έχουν υποστεί θέρμανση, ψύξη, ξήρανση και προσθήκη οξέων αλλά θεωρείται πλέον ότι η βλάβη δεν προκαλείται άμεσα από την καταπόνηση αλλά έμμεσα, για παράδειγμα λόγω απενεργοποίησης ενδονουκλεασών ή απώλειας μετάλλων, όπως το Mg^{2+} (Hurst, 1977, Wesche *et.al.*, 2009).



Εικόνα 1.6: Σχέσεις μεταξύ φυσιολογικών καταστάσεων μικροβιακών κυττάρων που υπόκεινται σε διαφορετικές καταπονήσεις. Απουσία καταπόνησης τα κύτταρα είναι υγιή. Όταν τους ασκείται ελαφρά καταπόνηση, τα κύτταρα βιώνουν στρες και ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί απόκρισης στην καταπόνηση. Η προσαρμογή στην συνθήκη καταπόνησης οδηγεί στην ανθεκτικότητα στην συγκεκριμένη συνθήκη. Τα κύτταρα δύναται να επανέλθουν στην υγιή κατάσταση. Με ακόμα εντονότερη καταπόνηση τα κύτταρα τραυματίζονται. Ο τραυματισμός είναι επίσης αναστρέψιμη διαδικασία. Όταν στα κύτταρα ασκείται έντονη καταπόνηση, θανατώνονται (Yousef & Courtney 2003).

1.3.1. Αξιολόγηση του υποθανάτιου τραυματισμού

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο πληθυσμός των κυττάρων τα οποία είναι υποθανάτια τραυματισμένα, δεν είναι ικανά να σχηματίσουν μοναδιαίες αποικίες σε θρεπτικό μέσο με έναν παράγοντα καταπόνησης. Συνεπώς, ο σχηματισμός αποικιών ή απουσία αυτών είναι ο καθοριστικός παράγοντας για τον χαρακτηρισμό κυττάρων ως τραυματισμένα ή μη. Οι επιλεκτικοί παράγοντες περιλαμβάνουν το χλωριούχο νάτριο (NaCl), χολικά άλατα, αντιβιοτικά, TeO_3^{2-} , δεοξυχολικό νάτριο (sodium deoxycholate), και θειώδες βισμούθιο (bismuth sulphite). Το χλωριούχο νάτριο προτιμάται ως επιλεκτικός παράγοντας επειδή είναι μη τοξικός για τον άνθρωπο, οικονομικός, εύκολα διαθέσιμος, και απλός στην παρασκευή (Kethireddy et.al., 2016). Το συγκεκριμένο επιλεκτικό μέσο εκτίμησε υψηλότερο ρυθμό μείωσης και τραυματισμό κυττάρων *L. monocytogenes* συγκριτικά με τρία άλλα μέσα σε καταπόνηση υψηλής θερμοκρασίας και όξινου περιβάλλοντος (Miller et.al., 2010). Ωστόσο το χλωριούχο νάτριο είναι μία ωσμωτική καταπόνηση η οποία επηρεάζει την βιωσιμότητα των κυττάρων. Για αυτόν τον λόγο, για την αξιολόγηση του τραυματισμού, χρησιμοποιούνται συγκεντρώσεις οι οποίες δεν αναστέλλουν την ανάπτυξη των κυττάρων για ένα δεδομένο στέλεχος, σε μία δεδομένη φάση ανάπτυξης και σε ένα δεδομένο μέγεθος εμβολίου απουσία καταπόνησης. Συγκεκριμένα, για να υπολογισθεί με ακρίβεια το ποσοστό των τραυματισμένων κυττάρων σε έναν πληθυσμό, προσδιορίζεται το MNIC-maximum non inhibitory concentration, η μέγιστη συγκέντρωση ουσίας η οποία δεν αναστέλλει την αύξηση του μικροοργανισμού. Εάν χρησιμοποιηθεί συγκέντρωση μεγαλύτερη του MNIC, τότε και ορισμένα υγιή κύτταρα δεν θα αναπτυχθούν ενώ εάν χρησιμοποιηθεί μικρότερη συγκέντρωση, ορισμένα τραυματισμένα κύτταρα θα θεωρηθούν υγιή, και σε κάθε περίπτωση οδηγούμαστε σε ψευδές αποτέλεσμα.

Ο υποθανάτιος τραυματισμός προσδιορίζεται ποσοτικά με τον τύπο:

$$\% \text{sublethal injury} = \left(1 - \frac{\text{counts on selective media}}{\text{counts on nonselective media}}\right) * 100 \quad \text{(Τύπος 1)}$$

Ωστόσο, δεν επιδρούν όλοι οι παράγοντες καταπόνησης με τον ίδιο τρόπο στην φυσιολογία των μικροοργανισμών. Επιπλέον, το χλωριούχο νάτριο δύναται να αλληλεπιδράσει με τον παράγοντα καταπόνησης, ιδιαίτερα αν αυτός είναι η αλλαγή του pH, και να αλλοιώσει το πραγματικό αποτέλεσμα. (Smolka e.al.,1974). Για αυτόν τον λόγο είναι χρήσιμο να χρησιμοποιούνται παράλληλα τεχνικές με τις οποίες μπορεί να αξιολογηθεί ο υποθανάτιος τραυματισμός, όπως η κυτταρομετρία ροής (flow cytometry) σε συνδιασμό με την μέθοδο του MNIC (Amor et.al., 2002, Espina et.al., 2016). Η εκτίμηση του τραυματισμού με μέτρηση της φάσης προσαρμογής (lag time) έδειξε υψηλότερο ποσοστό τραυματισμού από ότι η μέθοδος των γενικών και των επιλεκτικών υποστρωμάτων. Επιπλέον, οι μοριακές μέθοδοι δίνουν μεγαλύτερη βιωσιμότητα συγκριτικά με τις κλασσικές μεθόδους μικροβιολογίας (Kethireddy et.al., 2016). Τέλος, υπάρχουν μελέτες οι οποίες εμπλέκουν την ύπαρξη βιώσιμων αλλά όχι καλλιεργήσιμων κυττάρων (VBNC-viable but not culturable) (Amor et.al., 2002).

Από τα παραπάνω, είναι σαφές ότι η χρήση γενικών και επιλεκτικών υποστρωμάτων, είναι μία χρήσιμη μέθοδος της οποίας η αποτελεσματικότητα εξαρτάται από το είδος της καταπόνησης, τις συνθήκες επώασης, και το ποσοστό των κυττάρων στην κατάσταση VBNC.

1.4. Η επίδραση των καταπονήσεων σχετικών με περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων στην φυσιολογία του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*

1.4.1 Απολυμαντικά

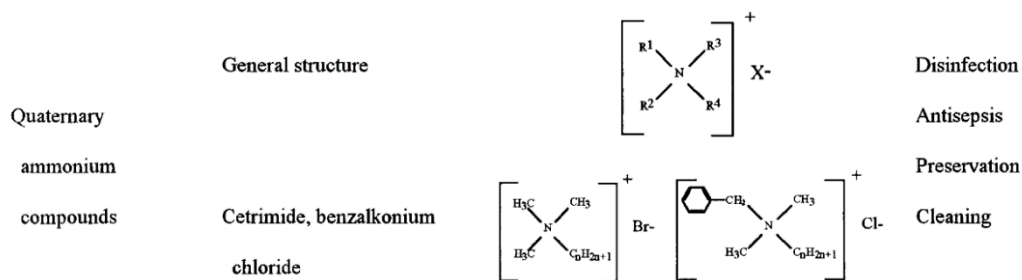
Είναι σαφές ότι ο έλεγχος της παρουσίας και της ανάπτυξης του *Listeria monocytogenes* σε τρόφιμα και περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων είναι εξαιρετικής σημασίας λόγω των επιπτώσεων που μία επιδημία θα μπορούσε να επιφέρει στην οικονομία και την δημόσια υγεία. Στην βιομηχανία τροφίμων, έχουν εγκαθιδρυθεί μέθοδοι για τον έλεγχο του πληθυσμού τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών. Ο καθαρισμός και στην συνέχεια η απολύμανση είναι αποτελεσματικά, σε πρώτο στάδιο εφαρμόζονται απορρυπαντικά τα οποία απομακρύνουν οργανικές ουσίες και έπειτα εφαρμόζονται ουσίες με απολυμαντική δράση που θανατώνουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Τα απολυμαντικά (disinfectants) είναι ο πλέον συνηθισμένος τρόπος απομάκρυνσης μικροοργανισμών στην βιομηχανία τροφίμων (Casey *et.al.*, 2014).

1.4.1.1. Quaternary Ammonium Compounds (QACs)-Τεταρτοταγείς ενώσεις αμμωνίου

Στην βιομηχανία τροφίμων, είναι πολύ συχνή η χρήση απορρυπαντικών όπως οι τεταρτοταγείς ενώσεις αμμωνίου (QACs) για την απολύμανση επιφανειών. Εδώ και αρκετά χρόνια έχει αποδειχτεί ότι οι συγκεκριμένες ενώσεις είναι αποτελεσματικές έναντι του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* (Mustapha and Liewen, 1989, Tuncan, 1993). Συνοπτικά, τα απορρυπαντικά είναι αμφίφιλα μόρια, φέρουν μία υδρόφιλη κεφαλή και μία υδρόφοβη ουρά από υδρογονάνθρακες. Τα υδρόφιλα μόρια της κεφαλής καθορίζουν εάν η απορρυπαντική ουσία είναι ανιονική, κατιονική, μη ιονική ή αμφοτερική γεγονός που καταδεικνύει τον τρόπο δράσης της (McDonnel and Russel, 1999). Τα QACs είναι κατιονικά, και θεωρούνται οι πλέον αποτελεσματικές αντισηπτικές και απολυμαντικές ουσίες. Η βακτηριοστατική τους δράση ξεκινά όταν η ουσία χρησιμοποιείται πέρα από την ελάχιστη συγκέντρωση, κάτω από την οποία δεν παρατηρείται δράση της ενεργούς ουσίας ακόμα και αν η εφαρμογή γίνεται σε μεγάλο χρονικό διάστημα (Tamburro *et.al.*, 2015). Η συγκέντρωση αυτή αποκαλείται Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration-MIC) και στην περίπτωση της χρήσης QACs έναντι *L. monocytogenes* κυμαίνεται μεταξύ 0.63 και 5.0 $\mu\text{g/ml}$ (Lundén *et.al.*, 2003).

Όταν τα QACs χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων με σκοπό την καταπολέμηση του *L.monocytogenes*, η εφαρμογή αφορά συγκεντρώσεις πολλαπλάσιες του MIC, συνήθως 1000 $\mu\text{g/L}$ = 1000 $\mu\text{g/ml}$ (Meyer,2006). Θεωρητικά αυτή η τακτική εξασφαλίζει την θανάτωση του συνόλου του πληθυσμού των μικροοργανισμών που βρίσκονται στα μηχανήματα και τις επιφάνειες. Ωστόσο σε περιπτώσεις όπου κύτταρα εκτίθεται σε απολυμαντικό συγκέντρωσης μη θανατηφόρας, αυτά δύναται να επιβιώσουν και να προσαρμοστούν στο νέο περιβάλλον (Aase *et.al.*,2000). Οι Sallam and Donnelly, 1992, μελέτησαν τον υποθανάτιο τραυματισμό που προκαλείται στον μικροοργανισμό *L. monocytogenes* χρησιμοποιώντας 4 απολυμαντικά, μεταξύ των οποίων 2 QACs και αναφέρουν διαφοροποιήσεις μεταξύ των στελεχών.

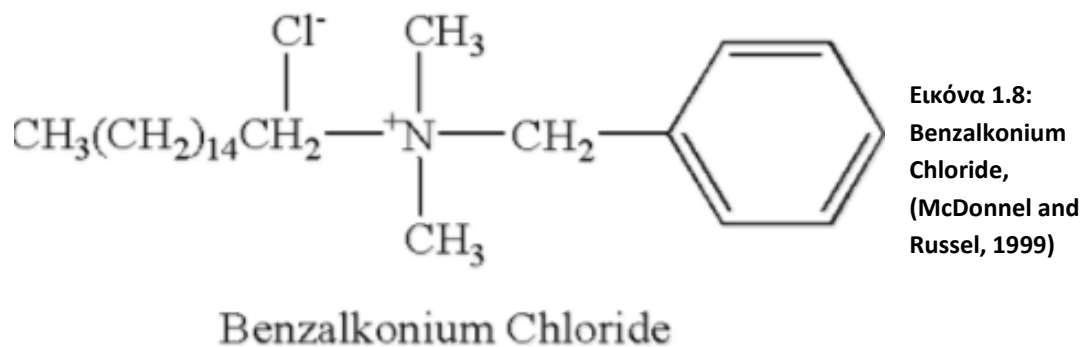
Τα QACs έχουν ως στόχο την κυτταρική μεμβράνη και δρουν αποδιοργανώνοντας δομικά το κύτταρο. Σε γενικές γραμμές, μεταβάλλουν την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών με αποτέλεσμα την αποδιοργάνωση της λιπιδικής διπλοστιβάδας και την διαρροή των κυτταρικών συστατικών. Ταυτόχρονα αποδομούνται οι πρωτεΐνες και τα νουκλειικά οξέα και τα αυτολυτικά ένζυμα λύουν το κυτταρικό τοίχωμα (McDonnel and Russel, 1999).



Εικόνα 1.7: Τεταρτοταγείς ενώσεις αμμωνίου και η χρήση τους στην βιομηχανία τροφίμων, (McDonnel and Russel, 1999)

1.4.1.2. Benzalkonium Chloride (BC)

Το Benzalkonium Chloride ανήκει στα QACs και χρησιμοποιείται για την απολύμανση επιφανειών ή ως αντισηπτικό στην βιομηχανία τροφίμων, ως συστατικό φαρμάκων, ως δερματικό αντισηπτικό και ως συστατικό προϊόντων ατομικής υγιεινής μεταξύ άλλων (Fazlara and Ekhtelat, 2013). Είναι μίγμα αλκυλβένζυλδιμεθυλαμμωνιακών χλωριδίων με τις αλκυλικές ομάδες να έχουν μήκος 12, 14 και 16 άτομα άνθρακα.



Ο υποθανάτιος τραυματισμός ο οποίος προκαλείται από το απολυμαντικό benzalkonium chloride στον *Listeria monocytogenes* δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Ωστόσο η ανοχή του μικροοργανισμού στο BC είναι πολύ συχνό φαινόμενο και έχει γίνει αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνών. Η εφαρμογή του απολυμαντικού σε υποθανάτιες συγκεντρώσεις, σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες όπως η εγκαθίδρυση ανεπαρκών μεθόδων απολύμανσης επιφανειών, ο σχηματισμός βιοϋμενίων, μειώνουν την απόδοση του απολυμαντικού (Muller et.al., 2013). Οι μοριακοί μηχανισμοί που οδηγούν σε ανοχή στο συγκεκριμένο

απολυμαντικό δεν έχουν γίνει απολύτως κατανοητοί. Οι Aase et.al.,2000, συσχέτισαν την ανοχή με την δράση αντλιών ενεργούς μεταφοράς πρωτονίων (proton motive force driven efflux pump). Οι Elhanafi et.al.,2010 βρήκαν ότι στο στέλεχος *L.monocytogenes* H7550 η ανοχή στο BC σχετίζεται με την δράση της κασέτας ανθεκτικότητας bcrABC (bcrABC resistance cassette) η οποία αποτελείται από το bcrA, έναν μεταγραφικό ρυθμιστή και το bcrBC, ο οποίος κωδικοποιεί μεταφορείς της οικογένειας SMR (small multidrug resistance-SMR (Elhanafi et.al.,2010). Το τρανσποσόνιο Tn6188 αναγνωρίστηκε πρόσφατα ως αιτία ανοχής στο BC σε πολλαπλά στελέχη (Muller et.al., 2013).

1.4.2. Χρήση οξέων για την καταπολέμηση παθογόνων μικροοργανισμών στην βιομηχανία τροφίμων

Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα περισσότερα τρόφιμα, όπως το κρέας, τα λαχανικά και τα ψάρια, παρουσιάζουν ελαφρώς όξινο pH, ενώ υπάρχουν τρόφιμα όπως το ασπράδι του αυγού, στο οποίο επικρατεί αλκαλικό pH. Η αλλαγή της οξύτητας των τροφίμων είναι γνωστή εδώ και πολλά χρόνια ως τρόπος συντήρησης τροφίμων (Levandowsky, 1980). Το pH του ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος του μικροοργανισμού επηρεάζεται άμεσα από το εξωκυτταρικό περιβάλλον. Για την μεταβολή του pH των μικροοργανισμών στόχων χρησιμοποιούνται ισχυρά οξέα, ασθενή οξέα και ιόντα. Τα ισχυρά οξέα, όπως το υδροχλωρικό και το φωσφορικό χρησιμοποιούν υψηλή εξωτερική συγκέντρωση πρωτονίων, οξειδώνοντας το ενδοκυτταρικό περιβάλλον και δεν χρησιμοποιούνται τυπικά σε τρόφιμα. Η απόκριση σε χαμηλό pH (Acid Tolerance Responce -ATR) έχει μελετηθεί εκτεταμένα στον μικροοργανισμό *L.monocytogenes*. (Begley and Hill, 2015). Οι κυριότεροι μηχανισμοί του ATR περιλαμβάνουν ένζυμα που δρουν ώστε να αυξήσουν το ενδοκυτταρικό pH, πρωτεΐνες οξειδωτικού στρες (acid shock proteins-ASPs) οι οποίες προστατεύουν και επιδιορθώνουν πρωτεΐνες και DNA και επαγωγή αλλαγών της σύστασης της κυτταρικής μεμβράνης (Alvarez-Ordóñez et.al., 2012).

Τα ασθενή οξέα, μεταξύ των οποίων και το γαλακτικό οξύ, χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά στην βιομηχανία τροφίμων. Τα μόρια αυτά, στην πρωτονιωμένη μορφή τους, διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα. Αν το κυτταρόπλασμα είναι πιο αλκαλικό από το pK_a του οξέος, τα μόρια οξέων θα αρχίσουν να απελευθερώνουν πρωτόνια στο κυτταρόπλασμα, με αποτέλεσμα αυτό να γίνει πιο όξινο. Αν το κύτταρο δεν είναι σε θέση να αυξήσει το pH του κυτταροπλάσματος, για παράδειγμα αν η συγκέντρωση πρωτονίων είναι πολύ μεγάλη, θανατώνεται (Ita and Hutkins, 1991). Το pH του κυττάρου μεταβάλλεται μέσω μηχανισμών που εμπλέκουν αντιμεταφορείς Νατρίου-πρωτονίων, αποκαρβοξυλάσες αμινοξέων και την F1F0 ATPase. Επιπλέον, παρουσία οργανικών οξέων συσσωρεύονται ανιόντα στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον, γεγονός που δύναται να καταστείλει την παραγωγή τελικών προϊόντων ποικίλων αντιδράσεων. (Carozzi et.al.,2009). Η καταστροφή του RNA αλλά και του DNA συσχετίζεται με περιβάλλοντα με χαμηλό pH, μάλλον λόγω της απομάκρυνσης Mg^{2+} (Wesche et.al.,2009).

1.4.2.2.Γαλακτικό οξύ (lactic acid)

Η δράση του γαλακτικού οξέος έναντι του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* έχει μελετηθεί εκτενώς (Ahmad and Marth, 1989, Ita and Hutkins, 1990, Oh and Marshall, 1993,

,Buchanan *et.al.*, 1994, Anang *et.al.*, 2007). Ο μικροοργανισμός επιβιώνει και πολλαπλασιάζεται σε χαμηλές τιμές pH, από 4.3 ως 5.2, ωστόσο το οξύ το οποίο μειώνει το pH του μέσου είναι καθοριστικός παράγοντας για την συμπεριφορά του μικροοργανισμού. Γενικότερα, τα ασθενή οξέα, όπως το γαλακτικό, είναι αποτελεσματικότερα στην αναστολή του *Listeria monocytogenes* συγκριτικά με ισχυρά οξέα, στο ίδιο pH, επειδή έχουν υψηλότερο pK_a . Το γαλακτικό οξύ αναστέλλει την ανάπτυξη του *Listeria monocytogenes* ακόμα και σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, 0.1%, ωστόσο ο πληθυσμός μειώνεται με τρόπο που εξαρτάται από την θερμοκρασία, και συγκεκριμένα, αναστολή αυξάνεται όσο μειώνεται η θερμοκρασία (Ahamad and Marth, 1989).

Αναφορικά με τον τραυματισμό, οι Ahamad και Marth συμπέραναν ότι εξαρτάται σημαντικά από την θερμοκρασία. Ο πληθυσμός μειώνονταν και ο τραυματισμός ξεκινούσε συντομότερα σε υψηλότερες θερμοκρασίες (35°C) συγκριτικά με χαμηλότερες (13°C). Η ίδια μελέτη δεν βρήκε σημαντική διαφορά ανάμεσα στα στελέχη *Listeria monocytogenes* (Ahamad and Marth, 1989). Οι Besse *et.al.*, μελέτησαν τον τραυματισμό που το γαλακτικό οξύ σε pH 4.7 προκαλεί στον *L.monocytogenes*. Βρήκαν ότι ο τραυματισμός μεταβάλλεται σημαντικά ανάλογα με την μήτρα του τροφίμου και κυμαίνονταν ανάμεσα σε 80±5% και 77±6% (Besse *et.al.*, 2000). Οι Sibanda και Buys χρησιμοποίησαν κυτταρομετρία ροής και δείκτες ακεραιότητας μεμβρανών (membrane integrity indicators) για να προσδιορίσουν τον τραυματισμό που προκαλεί η όξινη καταπόνηση από γαλακτικό οξύ σε pH 4.2, η ωσμωτική καταπόνηση η οποία προκλήθηκε από 10% NaCl και η αυξημένη θερμοκρασία 55°C για 30 λεπτά στον μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*. Έδειξαν ότι ο τραυματισμός διέφερε σημαντικά ανάμεσα στα τέσσερα στελέχη που μελέτησαν. Η όξινη καταπόνηση ήταν εκείνη που προκάλεσε περισσότερο τραυματισμό, ακολουθούμενη από το θερμικό σοκ, και τέλος από την ωσμωτική καταπόνηση (Sibanda and Buys, 2017).

Να σημειωθεί ότι στην περισσότερη βιβλιογραφία, οι μελέτες επικεντρώνονται σε τιμές pH πάνω από 4.0 για μεγάλα χρονικά διαστήματα, όπου είναι γνωστό ότι ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* δύναται να επιβιώσει. Ο τραυματισμός που προκαλείται από γαλακτικό οξύ pH 3.0 σε απιονισμένο νερό (d H₂O) μελετήθηκε μεταξύ άλλων από τους Shi *et.al.*, 2017 σε στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού *E.coli*. Η καταπόνηση διήρκεσε 30 λεπτά και οι ερευνητές σημειώνουν ότι ο τραυματισμός μειώνονταν όσο μειώνονταν η θερμοκρασία στην οποία έλαβε χώρα η καταπόνηση. Στους 4°C τα βακτήρια προστατεύονταν από την δράση του οξέος συγκριτικά με τους 25°C, 30°C και 37°C χάρη στην παραγωγή πρωτεϊνών σχετικών με την απόκριση σε καταπόνηση που προκαλείται από ψύχος (Shi *et.al.*, 2017). Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η επίδραση χαμηλού pH, στην τιμή 3.0, για χρονικό διάστημα ως 30 ώρες.

1.4.3. Ωσμωτική καταπόνηση

Στην βιομηχανία τροφίμων το Χλωριούχο Νάτριο, το κοινό αλάτι, χρησιμοποιείται ευρέως σαν συντηρητικός παράγοντας, καθώς η αντιμικροβιακή του δράση εμποδίζει την ανάπτυξη βακτηρίων σε έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (RTE foods). Όπως αναφέρουν οι Cole *et.al.*, 1990, ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* δύναται να επιβιώσει σε συγκεντρώσεις αλατιού έως και 3.0M. Η θερμοκρασία είναι σημαντικός παράγοντας για την επιβίωση του βακτηρίου παρουσία άλατος, με τις χαμηλότερες θερμοκρασίες να υποβοηθούν την

επιβίωση λόγω των μειωμένων μεταβολικών ρυθμών του βακτηριακού κυττάρου (Cole *et al.*, 1990). Η απόκριση του βακτηρίου στο ωσμωτικό σοκ διακρίνεται σε πρωτεύουσα και σε δευτερεύουσα, με την πρωτεύουσα απόκριση να αφορά την είσοδο ιόντων καλίου (K⁺) και γλουταμινικό στο κύτταρο ενώ η δευτερεύουσα την είσοδο μικρών μορίων, των συμβατών διαλυτών στοιχείων (compatible solutes). Αυτά τα μόρια συμβάλουν στην διατήρηση της ενζυμικής ενεργότητας όσο το κύτταρο μεταβάλλει την ωσμωτικότητα του κυτταροπλάσματος ώστε να επανέλθει η σπαργή. Εκτός από προστασία από άλατα, αυτά τα μόρια προστατεύουν τα ένζυμα από υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες. Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* συσσωρεύει κυρίως γλυκίνη (glycine), μεταΐνη (betaine) και καρνιτίνη (carnitine) σε υπερωσμωτικά περιβάλλοντα, μόρια που συναντώνται σε πληθώρα τροφίμων, τόσο φυτικής όσο και ζωικής προέλευσης, γεγονός που ίσως ενισχύει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού όταν βρίσκεται υπό ωσμωτική καταπόνηση (Fraser *et al.*, 2000, Sleator *et al.*, 2003)

Η έκθεση του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε υποθανάτιες συγκεντρώσεις άλατος ενέχει πιθανούς κινδύνους για την βιομηχανία τροφίμων. Ο υποθανάτιος τραυματισμός λόγω ωσμωτικής καταπόνησης δεν θεωρείται τόσο εκτεταμένος όσο σε άλλες καταπονήσεις όπως η όξινη ή η θερμική (Besse *et al.*, 2000, Sibanda and Buys, 2017). Ωστόσο, η ικανότητα του βακτηρίου να εισβάλλει σε επιθηλιακά κύτταρα αυξάνεται με έκθεση των κυττάρων σε υποθανάτιες συγκεντρώσεις άλατος 2.2% (Garner *et al.*, 2006). Χαμηλές συγκεντρώσεις άλατος, 4-6%, προστατεύουν τον μικροοργανισμό από καταπόνηση λόγω χαμηλού pH (Cole *et al.*, 1990). Στην περίπτωση έκθεσης του μικροοργανισμού σε χλωριούχο νάτριο συγκέντρωσης 5-10% στους 25°C για 6 ημέρες, παρατηρήθηκε επιμήκυνση των κυττάρων. Σε συγκέντρωση 5% έως 7% NaCl, βρέθηκε έντονη επιμήκυνση ινιδίων ακτίνης, γεγονός που συνεισφέρει στην άμεση αύξηση των βακτηρίων όταν οι συνθήκες γίνουν ξανά ευνοϊκές. Αυτό σημαίνει ότι το μέγεθος του πληθυσμού *Listeria monocytogenes* μπορεί να υποτιμηθεί σημαντικά σε τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση ακόμα και αν περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις άλατος (Isom *et al.*, 1995, Bereksi, *et al.*, 2002).

1.4.4.Λιμός (Starvation)

Οι Dickson και Frank, όρισαν την καταπόνηση του λιμού ως την «επιβίωση των βακτηρίων σε ολιγοτροφικά περιβάλλοντα, τα οποία διαθέτουν επαρκείς συγκεντρώσεις οξυγόνου αλλά η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών είναι περιορισμένη, και έτσι ο μικροοργανισμός δεν μπορεί να φέρει εις πέρας μεταβολικές διεργασίες και τον πολλαπλασιασμό» (Dickson and Frank, 1993). Ο λιμός είναι μία συνηθισμένη καταπόνηση που συναντά ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes*, καθώς μπορεί να βρεθεί σε πληθώρα θώκων, όπως σε τρόφιμα, σε εξοπλισμό, σε επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων, σε πατώματα, τοίχους, και στο νερό (Wesche *et al.*, 2009). Το στάδιο του καθαρισμού προηγείται της απολύμανσης σε χώρους επεξεργασίας τροφίμων και έχει στόχο την αποδόμηση και την απομάκρυνση τροφίμων και συστατικών τους πριν την χρήση απολυμαντικών που θανατώνουν τους μικροοργανισμούς.

Η κρυπτική ανάπτυξη είναι το φαινόμενο στο οποίο τα νεκρά κύτταρα γίνονται πηγή θρεπτικών συστατικών για τα εναπομείναντα κύτταρα. Έτσι, ορισμένα κύτταρα δύναται να

επιβιώσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα αφού σταματήσει η ανάπτυξη (Wesche et.al.,2009).

Απουσία θρεπτικών συστατικών, μεταβάλλονται τα επίπεδα των εξωπολυσακχαριτών στο βακτηριακό κύτταρο (Dickson and Frank. 1993) και προωθείται η είσοδος στην στατική φάση ανάπτυξης, η οποία χαρακτηρίζεται από αλλαγές στον κυτταρικό φάκελο, στην σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης και στην δομή του DNA, λόγω υπερέκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων. Επιπλέον, ο λιμός προκαλεί μείωση στο μέγεθος του κυττάρου και μείωση στην ρευστότητα των μεμβρανών. Όταν τα βακτήρια βιώνουν την συγκεκριμένη καταπόνηση, ενεργοποιούνται σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία επάγουν αλλαγές στην επιφάνεια του κυττάρου και χρήση εναλλακτικών πηγών ενέργειας. Τέλος, οι μορφολογικές αλλαγές στην επιφάνεια του κυττάρου ενισχύουν την ικανότητα των κυττάρων για προσκόλληση και ίσως συνεισφέρουν στον σχηματισμό βιουμενίων.

Ο Dykes μελέτησε για τέσσερις εβδομάδες τον τραυματισμό κυττάρων *Listeria monocytogenes* σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών σε θερμοκρασία 4°C σε PBS και παρατήρησε ότι σε όλα τα στελέχη προκλήθηκαν σαφείς μεταβολές στην φυσιολογία των κυττάρων. Το κυτταρόπλασμα απέκτησε ινώδη όψη, η κυτταρική μεμβράνη συρρικνώθηκε αφήνοντας κενό χώρο ανάμεσα σε εκείνη και το κυτταρικό τοίχωμα και το κυτταρικό τοίχωμα εμφάνισε οπές. Ο πληθυσμός δεν μειώθηκε σημαντικά, με εξαίρεση ένα στέλεχος, αλλά παρατηρήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις τραυματισμός ο οποίος ήταν εντονότερος όταν τα κύτταρα αντιμετώπιζαν λιμό σε διάλυμα με χαμηλό pH, 5.5. Εκτεταμένος τραυματισμός σημειώθηκε και στην περίπτωση επώασης του μικροοργανισμού παρουσία σορβικού καλίου, άλας με γνωστή συντηρητική δράση. Η ίδια μελέτη υποστηρίζει ότι η διαρροή αμινοξέων προέρχεται από τα νεκρά και όχι τα τραυματισμένα κύτταρα στην περίπτωση του λιμού (Dykes, 1999).

Υπάρχουν πολλές καταστάσεις οι οποίες μπορούν να θεωρηθούν λιμός. Εάν ο μικροοργανισμός διαβιεί σε περιβάλλον με έλλειψη έστω και ενός απαραίτητου θρεπτικού συστατικού, τότε ασκείτε σε αυτόν καταπόνηση. Ο απόλυτος λιμός, δηλαδή η έλλειψη όλων των θρεπτικών συστατικών, επιτυγχάνεται με εμβολιασμό των βακτηριακών κυττάρων σε νερό ή σε ισοτονικά διαλύματα (Jarvis et.al., 2017). Οι Besnard et.al, μελέτησαν τον λιμό σε στελέχη *L.monocytogenes* σε αποστειρωμένο νερό στους 4°C και 20°C απουσία και παρουσία 7%NaCl (Besnard et.al, 2000). Οι Jarvis et.al., μελέτησαν την επίδραση του λιμού στην ανάπτυξη και την φυσιολογία του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε αποστειρωμένο νερό στους 4°C. Τα στελέχη ScottA και EGD-e επιβίωσαν για τέσσερις εβδομάδες σε αυτό το μέσο, με το ScottA να μειώνεται απότομα. Η παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξε αποδόμηση των κυτταρικών μεμβρανών και δομικές αλλαγές του κυτταροπλάσματος. Έπειτα από χρήση μεταβολικών αναστολέων, οι ερευνητές βρήκαν ότι τα συγκεκριμένα στελέχη διατηρούν σε αυτές τις συνθήκες ενεργό μεταβολισμό, καθώς χρησιμοποιούν ενεργά μέρος του μεταβολικού μονοπατιού της γλυκόλυσης (Jarvis et.al., 2017).

1.4.5. Θερμικό σοκ

Η εφαρμογή θερμικού σοκ είναι η κύρια τεχνική στην βιομηχανία τροφίμων σήμερα για την καταπολέμηση παθογόνων μικροοργανισμών, μεταξύ των οποίων και ο *Listeria monocytogenes* (Rawson *et.al.*,2011). Η υψηλή θερμοκρασία προκαλεί καταστροφή των μεμβρανών, συσσωμάτωση ριβοσωμάτων, μείωση της ενεργότητας ενζύμων, παρεμπόδιση διεργασιών του μεταβολισμού που ελέγχονται από ένζυμα, αποδόμηση πρωτεϊνών και θραύση της έλικας του DNA (Man˜as and Paga˜n, 2004). Η απόκριση στο θερμικό σοκ ελέγχεται από τον σίγμα παράγοντα σ^{32} , ο οποίος είναι προϊόν έκφρασης του γονιδίου *rpoH* και οδηγεί σε υπερέκφραση heat shock proteins (HSPs)(Man˜as and Paga˜n, 2004). Πολλές HSPs δρουν ως τσαπερόνες (chaperons), βοηθώντας την αναδίπλωση πρωτεϊνών των οποίων η δομή επηρεάστηκε από την αυξημένη θερμοκρασία, τέτοιες τσαπερόνες είναι η GroEL και η DnaK, ή στοχεύοντας άλλες πρωτεΐνες για καταστροφή, όπως οι πρωτεάσες Lon και ClpAP (Arsene *et.al.*2000).

Πολυάριθμες μελέτες έχουν ασχοληθεί με την επίδραση της αυξημένης θερμοκρασίας στον μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*. Οι Beuchat *et.al.*,1986 αναφέρουν ότι ο πληθυσμός *Listeria monocytogenes* σε χυμό μειώνεται με αύξηση της θερμοκρασίας. Οι Golden *et.al.*, σύγκριναν την επιβίωση και τον τραυματισμό τεσσάρων στελεχών *L.monocytogenes* σε τρυπτόζη (tryptose phosphate broth) και συμπέραναν ότι το βακτήριο είναι ανθεκτικό στην αύξηση της θερμοκρασίας ως τους 54°C αλλά σε υψηλότερες θερμοκρασίες ο πληθυσμός μειώνεται ραγδαία όσο η θερμοκρασία αυξάνεται. Οι ίδιοι σημειώνουν ότι ο τραυματισμός διέφερε ανάλογα με το στέλεχος και έφτασε ως το 82% του συνολικού πληθυσμού (Golden *et.al.*,1988). Ο τραυματισμός φαίνεται να αυξάνεται όσο αυξάνεται η θερμοκρασία (Golden *et.al.*,1988, Miller *et.al.*, 2006, Wang *et.al.*,2017). Το στέλεχος ScottA όταν θερμαίνονταν στους 52°C για μία ώρα σε potassium phosphate buffer (pH 7.2) παρουσιάζει 46.4% τραυματισμό όταν το επιλεκτικό μέσο είναι τρυπτόζη με 5% χλωριούχο νάτριο (TPBA+S)(Smith and Archer, D.L., 1988).

Οι Guevara *et.al.*, 2015 μελέτησαν τον τραυματισμό που προκαλεί η θέρμανση σε 55°C στον *L. monocytogenes* απουσία ή παρουσία αιθερίων ελαίων σε TSBYE. Ο τραυματισμός έφτασε το 98.39±0.69% έπειτα από θέρμανση για μισή ώρα, απουσία αιθερίων ελαίων με την εκτίμηση του τραυματισμού να γίνεται με σύγκριση επιλεκτικού μέσου TSAYE με χλωριούχο νάτριο 5% και μη επιλεκτικό θρεπτικό μέσο TSAYE (Guevara *et.al.*, 2015). Οι Wang *et.al.*,2017 μελέτησαν τον υποθανάτιο τραυματισμό που προκαλούσε η θέρμανση στους 55.0°C, 57.5°C και 60°C σε στελέχη *S.enterica* και στους 60.0°C, 62.5°C και 65°C σε στελέχη *L.monocytogenes* σε υγρό (broth) και σε στερεό μέσο (agar). Ο τραυματισμός στην περίπτωση του *L.monocytogenes* ήταν μεγαλύτερος στο στερεό από ότι στο υγρό μέσο και αυξάνονταν όσο παρατεινόταν η έκθεση στην καταπόνηση. Κυμαίνονταν από 62% ως 80% στο υγρό θρεπτικό μέσο και από 87% ως 97% στο στερεό (Wang *et.al.*,2017).

1.5 Η σημασία της θερμοκρασίας, του μέσου και του στελέχους στην μελέτη της επιβίωσης και του τραυματισμού του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*.

A. Επιλογή της θερμοκρασίας μελέτης της επίδρασης των καταπονήσεων

Η θερμοκρασία που επιλέγεται για την μελέτη ενός φαινομένου είναι καθοριστικός παράγοντας του πειράματος. Η μελέτη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* αφορά συνήθως θερμοκρασίες μέσα στα όρια ανάπτυξης τις οποίες συναντά το βακτήριο κατά την επιμόλυνση και την διαβίωση στα τρόφιμα, κατά την επεξεργασία τροφίμων ή θερμοκρασίες που ο πληθυσμός παρουσιάζει την βέλτιστη ανάπτυξη. Οι 4°C επιλέγονται συχνά ως παράγοντας καταπόνησης αλλά και ως θερμοκρασία εφαρμογής της καταπόνησης. Το ίδιο ισχύει και για τις μελέτες που αφορούν τον τραυματισμό. Για παράδειγμα ο Dykes, 1999, οι Besnard *et.al.*, 2000 και οι Jarvis *et.al.*, 2017 μελέτησαν τον τραυματισμό κυττάρων *Listeria monocytogenes* σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών σε θερμοκρασία 4°C.

Η σύγκριση της επίδρασης καταπονήσεων και υποθανάτιου τραυματισμού σε δύο ή περισσότερες θερμοκρασίες είναι αρκετά συνήθης. Σε πολλές αναφορές συγκρίνονται χαμηλότερες θερμοκρασίες, όπως 4°C, 5°C και 7°C με υψηλότερες, 15°C, 20°C, 25°C ή και με θερμοκρασίες που ο μικροοργανισμός παρουσιάζει βέλτιστη ανάπτυξη, 30°C-37°C. Για παράδειγμα η μελέτη για τον υποθανάτιο τραυματισμό των Besnard *et.al.*, 2000 λαμβάνουν χώρα στους 4°C και 20°C, οι González-Tejedor *et.al.*, 2017, συγκρίναν την ανάπτυξη ή την αναστολή σε δύο μέσα στον μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes* στους 5°C, 10°C, 15°C και 25°C. Οι Bergholz *et.al.*, 2012 συμπέραναν ότι η απόκριση του βακτηρίου σε ωσμωτική καταπόνηση διαφέρει στις θερμοκρασίες 7°C και 37°C.

Όλες οι παραπάνω θερμοκρασίες παρουσιάζουν ενδιαφέρον για την βιομηχανία τροφίμων. Τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (RTE), συντηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα και επιμολύνονται με το βακτήριο συχνά σε αυτήν την θερμοκρασία. Πολλά τρόφιμα διατηρούνται στα ράφια στους 20°C και σε αυτήν την θερμοκρασία το βακτήριο παρουσιάζει μέγιστη κινητικότητα. Για αυτόν τον λόγο η παρούσα μελέτη εξέτασε τον τραυματισμό που προκαλείται από συνθήκες καταπόνησης σχετικές με τα περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων σε αυτές τις δύο θερμοκρασίες.

Οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται σε τρόφιμα τα οποία διατηρούνται στο ψυγείο, συνήθως στους 4°C, υφίστανται σοκ λόγω της ψύξης. Το σοκ προκύπτει όταν τα βακτήρια βιώνουν μείωση της θερμοκρασίας περιβάλλοντος τουλάχιστον 10°C σε ευαίσθητους μικροοργανισμούς (Mackey, 1984, Wesche *et.al.*, 2009). Η ευαισθησία των βακτηρίων σε χαμηλές θερμοκρασίες επηρεάζεται από το μέγεθος του αρχικού πληθυσμού και την διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ του αρχικού περιβάλλοντος και της ψύξης. Επιπλέον, το μέσο φαίνεται να είναι σημαντικός παράγοντας, το νερό και διαλύματα φτωχά σε θρεπτικά συστατικά δημιουργούν εντονότερη καταπόνηση σε χαμηλή θερμοκρασία συγκριτικά με τα πλούσια θρεπτικά μέσα (Mackey, 1984, Wesche *et.al.*, 2009).

Σε περιπτώσεις έκθεσης βακτηρίων σε χαμηλές θερμοκρασίες παρατηρούνται αλλαγές στη ρευστότητα της μεμβράνης και κατ' επέκταση, στην δράση των αντλιών και στον ρυθμό εισαγωγής θρεπτικών στοιχείων μέσα στο κύτταρο (Russell, 1990). Επιπλέον, οι χαμηλές θερμοκρασίες σταθεροποιούν κατά κάποιο τρόπο τις δομές των νουκλεϊκών οξέων, μειώνοντας έτσι την αποδοτικότητα της μεταγραφής και της μετάφρασης. Κάποιες πρωτεΐνες δύναται να μην αναδιπλωθούν σωστά ενώ παρατηρείται και παρεμπόδιση της δράσης των ριβοσωμάτων (Carozzi *et.al.*, 2009). Πολλά βακτήρια συνθέτουν πρωτεΐνες που προστατεύουν το κύτταρο σε χαμηλές θερμοκρασίες, όταν βρεθούν σε αυτές ακριβώς τις

συνθήκες (cold shock response) . Οι πρωτεΐνες είναι οι CSPs (cold shock proteins). Επίσης, υπό χαμηλές θερμοκρασίες, συσσωρεύονται στο κύτταρο συμβατά διαλυτά στοιχεία, όπως γλυκίνη, μεταΐνη και καρνιτίνη τα οποία προστατεύουν το βακτήριο (Angelidis, and Smith, 2003).

Οι χαμηλότερες θερμοκρασίες δύναται να προστατεύσουν τον μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes* από την δράση άλλων παραγόντων καταπόνησης. Οι Pittman et.al., 2014 για παράδειγμα σημειώνουν ότι έκθεση σε 4°C προστάτευσε τα βακτήρια έναντι ωσμωτικής καταπόνησης συγκριτικά με τους 37°C. Αναφορικά με τον τραυματισμό, οι Ahamad και Marth συμπέραναν ότι εξαρτάται σημαντικά από την θερμοκρασία. Ο πληθυσμός μειώνονταν και ο τραυματισμός ξεκινούσε συντομότερα σε υψηλότερες θερμοκρασίες (35°C) συγκριτικά με χαμηλότερες (13°C).

B. Επιλογή του μέσου μελέτης της επίδρασης των καταπονήσεων

Υπάρχουν πολλά μέσα, στερεά και υγρά στα οποία μελετάται η ανάπτυξη, η αναστολή ή η επίδραση μίας ή περισσοτέρων καταπονήσεων στον μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*. Το βακτήριο αναπτύσσεται σε μέσα πλούσια σε θρεπτικά στοιχεία όπως το TSB (tryptone soya broth) παρουσία ή απουσία YE (yeast extract) ή το BHI (brain heart infusion). Ωστόσο η χρήση των παραπάνω αντενδείκνυται στην μελέτη της καταπόνησης καθώς σε περιβάλλοντα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά καταστέλλεται η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την μολυσματική δράση του *Listeria monocytogenes* (virulence genes) (Gray et.al., 2006, Jarvis et.al., 2017).

Κάθε ερευνητής επιλέγει τα μέσα τα οποία θα χρησιμοποιήσει με βάση το ερώτημα του. Στον *Listeria monocytogenes* δεν έχει καθιερωθεί συγκεκριμένο μέσο για την μελέτη της φυσιολογίας, της παθογένειας, της επίδρασης των καταπονήσεων ή του κυτταρικού τραυματισμού. Πιθανώς αυτό οφείλεται στην πληθώρα βιοχημικών μονοπατιών που παραμένουν ανεξερεύνητα και στην διαφορά που παρατηρείται στην συμπεριφορά του βακτηρίου ανάλογα με το στέλεχος υπό μελέτη (Jarvis et.al., 2017). Κάθε μέσο έχει διαφορετική σύσταση ή έλλειψη σε πηγές άνθρακα, βιταμίνες, αμινοξέα, μέταλλα και ρυθμιστικούς παράγοντες και συνεπώς δημιουργεί διαφορετικό περιβάλλον για τον μικροοργανισμό. Ο τραυματισμός που παρατηρείται σε δύο ή περισσότερα μέσα δεν είναι πάντα ίδιος για ένα δεδομένο στέλεχος, σε καταπόνηση συγκεκριμένης έντασης δύναται να παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές. Για αυτόν τον λόγο, όταν γίνεται σύγκριση μεταξύ πειραμάτων καταπονήσεων απαιτείται προσοχή στο μέσο στο οποίο έλαβαν χώρα τα πειράματα (Jarvis et.al., 2017).

Το διάλυμα Ringer ανήκει στα μέσα που διατηρούν τα κύτταρα σε ωσμωτική ισορροπία και χρησιμοποιείται συχνά στην μελέτη του λιμού. Το ίδιο ισχύει και για το καθαρό νερό, το οποίο όμως ασκεί ωσμωτική καταπόνηση στα κύτταρα (Jarvis et.al., 2017). Η έκθεση μικροοργανισμών στα δύο αυτά διαλύματα οδηγεί σε απόλυτο λιμό, καθώς δεν παρέχουν θρεπτικά συστατικά στο κύτταρο. Για αυτό τον λόγο χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, τόσο στην μελέτη του τραυματισμού που προκαλείται από λιμό, παρουσία ή απουσία ελαφράς ωσμωτικής καταπόνησης όσο και στις υπόλοιπες προς μελέτη καταπονήσεις, ώστε να προκύψουν συγκρίσιμα δεδομένα.

Γ. Μεταβλητότητα των στελεχών στην μελέτη των καταπονήσεων

Διαφορετικά στελέχη που ανήκουν στο ίδιο είδος μικροοργανισμού δύναται να παρουσιάζουν ομοιότητες αλλά και σημαντικές διαφορές στην φυσιολογία και την απόκρισή τους σε συνθήκες καταπόνησης. Η μεταβλητότητα μεταξύ στελεχών σχετίζεται με την παρουσία ή απουσία γενετικών τόπων στο γονιδίωμα των βακτηρίων (Begley and Hill, 2015). Για παράδειγμα, στον μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes* το γονίδιο gadD1T1 κωδικοποιεί την αποκαρβοξυλάση του γλουταμινικού και τον μεταφορέα της και συσχετίζεται με την επιβίωση του βακτηρίου σε ελαφρώς όξινες συνθήκες. Στελέχη που φέρουν το γονίδιο επιβιώνουν παρουσία της συγκεκριμένης καταπόνησης σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με τα στελέχη που δεν το φέρουν (Cotter *et al.* 2005, Van der Veen *et al.* 2008). Επιπλέον, η ρύθμιση ομάδων γονιδίων δύναται να διαφέρει παρουσία παραγόντων καταπόνησης, ιδιαίτερα μεταξύ στελεχών που απέχουν γενεαλογικά. Οι Oliver *et al.*, 2010 μελέτησαν το ρεγκουλόνιο (regulon) SigB τεσσάρων στελεχών *L. monocytogenes* από διαφορετικές φυλογενετικές γραμμές (lineages) και σημείωσαν ότι παρά το γεγονός ότι σε κάθε στέλεχος το ρεγκουλόνιο έφερε τον ίδιο αριθμό γονιδίων, ο αριθμός των γονιδίων που εκφράζονταν διέφερε (Oliver *et al.*, 2010, Begley and Hill, 2015).

Αναφορικά με τον τραυματισμό, υπάρχουν μελέτες με αξιοσημείωτες διαφορές ανάμεσα στα στελέχη, όπως των (Sibanda and Buys, 2017) που προσδιόρισαν τον υποθανάτιο τραυματισμό που προκαλείται από γαλακτικό οξύ σε pH 4.2, ωσμωτική καταπόνηση η οποία προκλήθηκε από 10% NaCl και η αυξημένη θερμοκρασία 55°C για 30 λεπτά στον μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*. Οι Jarvis *et al.* μελέτησαν την επίδραση του λιμού στα στελέχη ScottA και EGD-e, με το ScottA να μειώνεται απότομα (Jarvis *et al.*, 2017). Οι Golden *et al.* σύγκριναν την επιβίωση και τον τραυματισμό από αυξημένη θερμοκρασία τεσσάρων στελεχών *L. monocytogenes* και σημειώνουν σημαντικές διαφορές ανάλογα με το στέλεχος (Golden *et al.*, 1988). Οι Sallam and Donnelly, 1992 μελέτησαν υποθανάτιο τραυματισμό στελεχών *L. monocytogenes* από απολυμαντικά και αναφέρουν διαφοροποίηση ανάλογα με το στέλεχος. Αντίθετα, τα προς μελέτη στελέχη δύναται να μην παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές, όπως στην περίπτωση των Ahamad και Marth που μελέτησαν τον τραυματισμό *Listeria monocytogenes* από γαλακτικό οξύ. (Ahamad and Marth, 1989).

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε ο υποθανάτιος τραυματισμός σε δύο στελέχη διαφορετικών οροτύπων. Τα δύο στελέχη απέχουν φυλογενετικά και έχουν απομονωθεί από διαφορετικά περιβάλλοντα. Τα παραπάνω συνέβαλαν στην επιλογή τους για την περάτωση των συγκεκριμένων πειραμάτων. Το στέλεχος ScottA απομονώθηκε κλινικά για πρώτη φορά έπειτα από περιστατικά λιστερίωσης στην Μασαχουσέτη το 1983 (Fleming *et al.*, 1985) και έκτοτε ο ορότυπος 4b χρησιμοποιείται ευρέως σε δοκιμές αποτελεσματικότητας τεχνικών επεξεργασίας και συντήρησης τροφίμων, στην θέσπιση μεθόδων ανίχνευσης σε τρόφιμα, σε μελέτες αύξησης και ανθεκτικότητας σε υψηλές θερμοκρασίες καθώς και σε μελέτες που αφορούν την τοξικότητα (virulence) (Briers *et al.*, 2011). Το στέλεχος EGD-e προέρχεται από το στέλεχος EGD από το οποίο όμως διαφέρει σημαντικά γενετικά και απομονώθηκε από τον E.G.D Murray το 1926. Ονομάστηκε έτσι κατά το πρόγραμμα γονοτύπησης με το “e” να συμβολίζει το “European” (Bécavin *et al.*, 2014).

1.6. Υπόθεση Εργασίας

Ποσοτική αξιολόγηση του υποθανάτιου τραυματισμού σε κύτταρα του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* υπό συνθήκες καταπόνησης που σχετίζονται με την επεξεργασία και περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων και σύγκριση του υποθανάτιου τραυματισμού στις διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και μέσω διαλύσεων για τα δύο προς μελέτη στελέχη.

Ένας πληθυσμός βακτηριακών κυττάρων δεν είναι ομοιογενής και η έκθεση σε υποθανάτια ένταση καταπονήσεις δημιουργεί υποπληθυσμούς ανάλογα με την ικανότητά του κάθε κυττάρου να ανταπεξέρχεται στην καταπόνηση (Yousef and Courtney 2003). Για αυτόν τον λόγο, ορισμένα βακτηριακά κύτταρα θανατώνονται, κάποια τραυματίζονται ενώ άλλα παραμένουν υγιή. Τα τραυματισμένα κύτταρα δύναται μελλοντικά να ανακάμψουν όταν οι συνθήκες το επιτρέψουν. Στην βιομηχανία τροφίμων, οι μικροοργανισμοί αντιμετωπίζουν συχνά υποθανάτιες καταπονήσεις ή καταφέρνουν να επιβιώσουν έπειτα από έκθεση σε ένταση καταπόνησης η οποία θεωρούνταν θανατηφόρα. Συνεπώς η μελέτη του τραυματισμού τροφιμογενών μικροοργανισμών από καταπονήσεις που συναντώνται στην βιομηχανία τροφίμων παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον.

Ένας τέτοιος παθογόνος τροφιμογενής μικροοργανισμός είναι ο *Listeria monocytogenes*, ο οποίος επιβιώνει σε ευρύ φάσμα οικολογικών θώκων και συνθηκών και ενέχει κινδύνους για την δημόσια υγεία και την οικονομία καθώς τα κρούσματα λιστερίωσης παγκοσμίως αυξάνονται σημαντικά την τελευταία δεκαετία.

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η ποσοτική μελέτη του υποθανάτιου τραυματισμού που προκαλείται στον παθογόνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*. Ο τραυματισμός προκύπτει από καταπονήσεις με τις οποίες το βακτήριο έρχεται συχνά αντιμέτωπο σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων. Εκείνες περιλαμβάνουν τον λιμό και τον λιμό σε συνδυασμό με προσθήκη χλωριούχου νατρίου, την αυξημένη θερμοκρασία 55°C, το γαλακτικό οξύ σε χαμηλό pH, 3.0 και το απολυμαντικό Benzalkonium Chloride της κατηγορίας των τεταρτοταγών ενώσεων αμμωνίου. Η επίδραση που έχουν όλες αυτές οι καταπονήσεις στην ανάπτυξη, και ίσως σε λιγότερο βαθμό στην φυσιολογία του μικροοργανισμού έχουν ήδη μελετηθεί, ο τραυματισμός ωστόσο, είναι ένα φαινόμενο το οποίο έχει διερευνηθεί σε σαφώς μικρότερη κλίμακα.

Η αξιολόγηση και ποσοτικοποίηση του υποθανάτιου τραυματισμού επιτεύχθηκε με σύγκριση του πληθυσμού *Listeria monocytogenes* όπως αυτός προσδιορίστηκε σε επιλεκτικά και μη επιλεκτικά θρεπτικά μέσα. Ως μη επιλεκτικό μέσο επιλέχτηκε το TSAYE ενώ ως επιλεκτικό το TSAYE με χλωριούχο νάτριο (NaCl). Ένας από τους αρχικούς στόχους της μελέτης ήταν η εύρεση της μέγιστης μη ανασταλτικής συγκέντρωσης άλατος (MNIC) για κάθε προς μελέτη στέλεχος του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* στην μέση στατική φάση ανάπτυξης, σε δεδομένο μέγεθος εμβολίου.

Οι συνθήκες που κάθε ερευνητής επιλέγει για να εξετάσει το ερώτημά του, είναι συχνά τόσο σημαντικές όσο το ίδιο το ερώτημα και είναι καθοριστικής σημασίας για το αποτέλεσμα που παρουσιάζει. Ειδικότερα στην μελέτη του υποθανάτιου τραυματισμού, καμία μελέτη δεν είναι απόλυτα συγκρίσιμη με κάποια άλλη, καθώς τα στελέχη, η θερμοκρασία καταπόνησης, οι διαλύτες, τα επιλεκτικά και μη επιλεκτικά μέσα, η ένταση των καταπονήσεων, η φάση

ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων και ο αρχικός βακτηριακός πληθυσμός καθορίζουν τα τελικά συμπεράσματα. Στην παρούσα μελέτη ο τραυματισμός μελετήθηκε σε δύο στελέχη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*. Ορισμένες καταπονήσεις όπως ο λιμός, η χρήση απολυμαντικών και η αυξημένη θερμοκρασία αναφέρεται ότι προκαλούν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα στελέχη που μελετήθηκαν (Jarvis *et.al.*,2017, Sallam and Donnelly, 1992, Golden *et.al.*,1988) ενώ άλλες όπως η όξινη καταπόνηση όχι (Ahamad and Marth, 1989). Υπό αυτή τη σκοπιά ήταν ενδιαφέρον να μελετήσουμε για κάθε καταπόνηση εάν και υπό ποιες συνθήκες υπάρχει διαφοροποίηση στην επιβίωση και τον τραυματισμό στα δύο στελέχη που επιλέχθηκαν.

Η θερμοκρασία στην οποία οι καταπονήσεις ασκούνται στον μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes* είναι παράγοντας που επηρεάζει τόσο την επιβίωση όσο και τον τραυματισμό των κυττάρων. Έχει βρεθεί ότι σε χαμηλότερες θερμοκρασίες επάγονται μηχανισμοί οι οποίοι δύνανται να προστατεύουν το κύτταρο από φυσιολογική μεταβολή και συνεπώς από τραυματισμό (Angelidis, and Smith, 2003, Ahamad and Marth, 1989). Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, ο υποθανάτιος τραυματισμός μελετήθηκε σε δύο θερμοκρασίες, τους 4°C και τους 20°C. Και οι δύο θερμοκρασίες είναι ενδιαφέρουσες για την μελέτη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*. Ο μικροοργανισμός επιβιώνει και αυξάνεται σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών, περιλαμβανομένων και των 4°C. Τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (RTE), συντηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα και επιμολύνονται με το βακτήριο συχνά σε αυτήν την θερμοκρασία. Πολλά τρόφιμα διατηρούνται στα ράφια στους 20°C και σε αυτήν την θερμοκρασία το βακτήριο παρουσιάζει έντονη κινητικότητα. Για τους παραπάνω λόγους επιλέχθηκαν οι δύο θερμοκρασίες για την μελέτη της επίδρασης του συγκεκριμένου παράγοντα στον κυτταρικό τραυματισμό έπειτα από έκθεση σε διαφορετικές καταπονήσεις.

Το μέσο στο οποίο διαβιούν τα τραυματισμένα κύτταρα είναι εξίσου σημαντικό με τους προαναφερθέντες παράγοντες. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας επιλέχθηκαν μέσα τα οποία δεν θα παρείχαν θρεπτικά συστατικά στα βακτήρια ώστε να επιτευχθεί απόλυτος λιμός. Ισοτονικά διαλύματα και νερό είναι συνηθισμένα μέσα για την μελέτη του λιμού. Τα ίδια μέσα χρησιμοποιήθηκαν στην περίπτωση όλων των καταπονήσεων. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκε ως μέσο διάλυσης το Ringer το οποίο διατηρεί τα βακτήρια σε ωσμωτική ισορροπία και απεσταγμένο νερό-Microcosm Water. Συνεπώς, ένας από τους στόχους της μελέτης ήταν η μελέτη του τραυματισμού στα δύο μέσα διάλυσης.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Στελέχη *Listeria monocytogenes*

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη *Listeria monocytogenes*, το ScottA και το EGD-e τα οποία ανήκουν στην μικροβιακή συλλογή του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το στέλεχος ScottA ανήκει στον ορότυπο 4b ενώ το στέλεχος EGD-e ανήκει στον ορότυπο 1/2a.

2.2 Προετοιμασία Εμβολίου

Τα στελέχη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* διατηρούνται στο εργαστήριο σε θρεπτικό μέσο Tryptone Soy Broth με 0,6% Yeast Extract (TSB-YE) σε 20% v/v γλυκερόλη στους -20°C. Από αυτήν την πηγή- stock πραγματοποιούνται δύο ανανεώσεις, μία πρώτη διάρκειας 24h και η δεύτερη διάρκειας 18h σε TSBYE στους 30°C. Κατόπιν γίνονται γραμμική εξάπλωση (streaking) σε τρυβλία Tryptone Soy Agar 0,6% Yeast Extract (TSAYE). Τα τρυβλία επωάζονται για δύο ημέρες στους 37°C και έπειτα φυλάσσονται στους 4°C. Από αυτό το stock λαμβάνονται μοναδιαίες αποικίες για την δημιουργία εμβολίων. Τα τρυβλία χρησιμοποιούνται ως και τέσσερις εβδομάδες.

Αναφορικά με το εμβόλιο, αρχικά γίνεται ανανέωση της καλλιέργειας του μικροοργανισμού σε ασηπτικές συνθήκες. Από τα τρυβλία-stock λαμβάνεται μοναδιαία αποικία με χρήση αποστειρωμένης πλαστικής ράβδου. Κατά την πρώτη ανανέωση της καλλιέργειας, η αποικία εισάγεται σε πλαστικό δοχείο Falcon όγκου 15ml σε 10ml αποστειρωμένου TSBYE και επωάζεται στους 30°C για 24h. Μετά το πέρας αυτού του χρόνου ακολουθεί μία δεύτερη ανανέωση όπου λαμβάνονται 100μl της πρώτης ανανέωσης και εισάγονται σε 10ml αποστειρωμένου TSBYE. Η καλλιέργεια τοποθετείται στους 30°C για 18h. Σε αυτό το χρονικό διάστημα τα κύτταρα έχουν φτάσει στην μέση στατική φάση ανάπτυξης. Οι λεγόμενες ανανεώσεις λαμβάνουν χώρα ώστε ο μικροοργανισμός να βρίσκεται σε αφθονία θρεπτικών και να προκύψει η αύξηση της καλλιέργειας. Στο τέλος της επώασης η τελική συγκέντρωση *Listeria monocytogenes* είναι 10^9 CFU/ml για το στέλεχος ScottA και 10^8 logCFU/ml για το στέλεχος EGD-e.

Η προετοιμασία του εμβολίου περιλαμβάνει τρεις (3) διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στις 3.600 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C. Έπειτα από κάθε φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθενται 10ml ισοτονικό διάλυμα Ringer ¼ strength. Σκοπός του καθαρισμού είναι η απομάκρυνση μεταβολικών προϊόντων των κυττάρων καθώς και θρεπτικών συστατικών. Στην τρίτη πλύση με διάλυμα Ringer, προστίθεται 10 φορές λιγότερο διάλυμα στον περιέκτη με κύτταρα του στελέχους EGD-e ώστε η αρχική ποσότητα των κυττάρων στο πείραμα να είναι η ίδια και ίση με 10^7 CFU/ml

2.3. Πειραματική διαδικασία

Όπως προαναφέρθηκε στην ενότητα 1.6, στόχος της εργασίας ήταν να εκτιμηθεί το ποσοστό των τραυματισμένων κυττάρων σε δύο στελέχη *Listeria monocytogenes*. Ο τραυματισμός επιτεύχθηκε με έκθεση ενός αρχικού πληθυσμού (10^7 CFU/ml) σε συγκεκριμένες καταπονήσεις. Ο αρχικός πληθυσμός λαμβάνονταν από την Β' Ανανέωση και εισαγόταν σε

διαλύματα που περιείχαν τον παράγοντα καταπόνησης διαλυμένο σε ισοτονικό διάλυμα Ringer Microcosm Water. Με την ένεση του μικροοργανισμού στο διάλυμα άρχισε η χρονομέτρηση του πειράματος και γίνονταν η πρώτη δειγματοληψία σε TSAYE ώστε να υπολογισθεί το μέγεθος του πληθυσμού και να εκτιμηθεί ο αρχικός τραυματισμός. Μετά την έκθεση ο πληθυσμός επωάζονταν στους 4°C ή στους 20°C και ακολουθούσαν δειγματοληψίες ανά διαστήματα που είχαν καθοριστεί από προηγούμενες δοκιμές ώστε να παρακολουθείται το μέγεθος του πληθυσμού και ο τραυματισμός. Με τον εμβολιασμό κάθε δείγματος ακολουθούσε αμέσως η πρώτη δειγματοληψία και το δείγμα τοποθετούνταν στην θερμοκρασία επώασης. Επιπλέον, πάντα λαμβάνονταν δείγμα από τα εμβόλια, τα οποία επιστρώνονταν επιφανειακά σε τρυβλία με TSAYE με σκοπό να βεβαιωθεί η καθαρότητα τους. Στα πειράματα που περιγράφονται παρακάτω, τα χρονικά διαστήματα μεταξύ των δειγματοληψιών καταγράφονταν και τηρούνταν με αυστηρότητα. Τα δείγματα παρέμεναν στην θερμοκρασία επώασης σε όλη την διάρκεια του πειράματος.

Κάθε συνθήκη καταπόνησης που αναφέρεται, μελετήθηκε σε τρεις (3) ή δύο (2) ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις. Πριν τις επαναλήψεις αυτές είχαν προηγηθεί δοκιμασίες ώστε να καθοριστούν οι διάφορες παράμετροι του πειράματος, όπως οι θερμοκρασίες, η συχνότητα των δειγματοληψιών, και οι συγκεντρώσεις των απολυμαντικών ή το pH των προστιθέμενων διαλυμάτων. Επιπλέον, κάθε βιολογική επανάληψη είχε δύο τεχνικές επαναλήψεις, δηλαδή στο κάθε πείραμα το κάθε δείγμα υπήρχε εις διπλούν.

Οι καταπονήσεις που μελετήθηκαν ήταν το lactic acid-L.A. (γαλακτικό οξύ) σε pH 3.0 για 30 ώρες, το Benzalkonium Chloride-B.C. σε συγκέντρωση 10ppm ή 10^{-3} mg/ml για 6 ώρες, η έκθεση σε θερμοκρασία 55°C για 120 λεπτά, ο λιμός, δηλαδή η συντήρηση απουσία θρεπτικών συστατικών και ο λιμός παρουσία χλωριούχου νατρίου 7%w/v για 8 εβδομάδες.

2.4. Θρεπτικά Υποστρώματα/ διαλύματα

A. Θρεπτικά Υποστρώματα

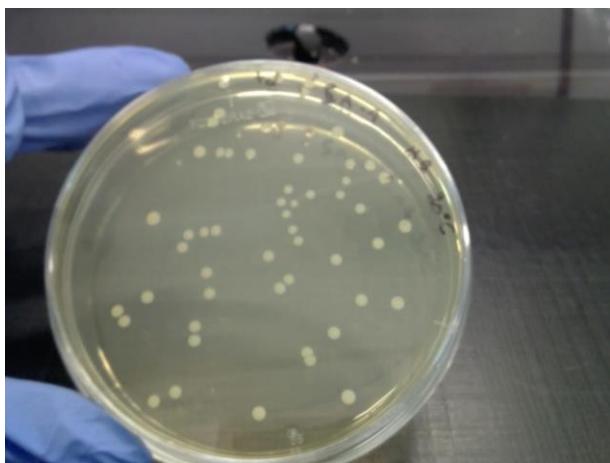
Όπως προαναφέρθηκε, στην παρούσα μελέτη, σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία για κάθε πειραματική διαδικασία λαμβάνονταν δείγμα από διαλύματα που περιείχαν *Listeria monocytogenes*.

Το δείγμα αυτό εισάγονταν υπό ασηπτικές συνθήκες σε τρυβλίο Petri (Petri dish) το οποίο περιείχε στερεοποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα που υποστήριζε την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Το υπόστρωμα ήταν TSA- Tryptone Soya Agar με 0,6% περιεκτικότητα σε Yeast Extract. Το συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο συνιστάται για την καλλιέργεια του *Listeria monocytogenes* από την επιτροπή του ISO στον κανονισμό ISO:10560:1993.

Για την παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος ακολουθούνται οι οδηγίες της εταιρίας από την οποία το εργαστήριο προμηθεύτηκε το υλικό (Sigma-Aldrich). Για ένα (1) λίτρο παρασκευάσματος ζυγίζεται σε ζυγό ακριβείας 40g TSA, το οποίο αποτελείται από άγαρ (agar), ενζυμικό υδρόλυμα καζεΐνης (casein enzymic hydrolysate), δεξτρόζη (dextrose), όξινο φωσφορικό κάλιο (dipotassium hydrogen phosphate) και παπαική πέψη αλεύρου σόγιας (papain digest of soybean meal). Σε αυτό προστίθενται 6g Yeast Extract και 1 λίτρο απιονισμένο νερό. Ακολουθεί έντονη ανάδευση ώπου το μίγμα να ομογενοποιηθεί και

θέρμανση στους 121°C για 30 λεπτά. Με ανάλογο τρόπο παρασκευάζεται και το TSBYE το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία καλλιεργειών, όπως αναφέρεται στην ενότητα 2.2. Αντίστοιχα παρασκευάζεται το TSAYE με θρεπτικά από την εταιρία Oxoid.

Κατά την δειγματοληψία, εκτός από το γενικό θρεπτικό υπόστρωμα, χρησιμοποιούταν και ένα επιλεκτικό υπόστρωμα. Αυτό γινόταν με σκοπό την εκτίμηση του ποσοστού των τραυματισμένων κυττάρων στον πληθυσμό. Τα ζωντανά και υγιή κύτταρα πολλαπλασιάζονταν και έδιναν ορατές αποικίες σε όλα τα υποστρώματα ενώ τα τραυματισμένα μόνο στο γενικό υπόστρωμα. Τα τρυβλία με το γενικό υπόστρωμα επώαζονταν για δύο (2) ημέρες στους 37°C, κατόπιν οι αποικίες μετρούνταν και τα τρυβλία καταστρέφονταν θερμικά στους 135°C για 15 λεπτά. Οι αποικίες των τρυβλίων με το επιλεκτικό υπόστρωμα καταμετρούνταν στις 2 και στις 5 ημέρες παραμονής τους στους 37°C.



Εικόνα 2.1: Αποικίες *Listeria monocytogenes* σε θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE, έπειτα από επώαση για 48h στους 37°C.

Το επιλεκτικό υπόστρωμα που επιλέχθηκε για την εκτίμηση του τραυματισμού ήταν το TSAYE με κλινές συγκέντρωσης αλατιού. Η παρασκευή του επιλεκτικού υποστρώματος γίνονταν με τον ίδιο τρόπο που αναφέραμε και στην περίπτωση του γενικού. Ωστόσο, μετά την ζύγιση του θρεπτικού υποστρώματος TSAYE, προστίθετο αλάτι ώστε να επιτευχθεί η τελική επιθυμητή συγκέντρωση. Ακολουθούσε σταδιακή εισαγωγή απιονισμένου νερού (d H₂O) και ανάδευση έως ότου το μείγμα να ομογενοποιηθεί. Το μείγμα ογκομετρούταν ώσπου ο όγκος του να είναι 1 λίτρο και θερμαίνονταν στους 121°C για 30 λεπτά.

Η θέρμανση σε τόσο υψηλή θερμοκρασία έχει ως στόχο την αποστείρωση των θρεπτικών υποστρωμάτων και των διαλυμάτων. Μετά την αποστείρωση, τα θρεπτικά υλικά επιστρώνονταν σε τρυβλία petri υπό ασηπτικές συνθήκες και αφήνονταν να πήξουν.

B. Διαλύματα

Η καταπόνηση λάμβανε χώρα είτε σε ισοτονικό διάλυμα Ringer ¼ strength είτε σε δισαπεσταγμένο απιονισμένο νερό. Το διάλυμα Ringer ¼ παρέχεται σε ταμπλέτες από την εταιρία Sigma-Aldrich και περιέχει άλατα τα οποία διατηρούν τα βακτήρια σε ωσμωτική ισορροπία. Μία ταμπλέτα διαλύονταν υπό ανάδευση σε 500ml απιονισμένο νερό και έπειτα

θερμαίνονταν στους 121°C για 30 λεπτά. Το απεσταγμένο απιονισμένο νερό (Microcosm Water) φιλτράρονταν υπό κενό και κατόπιν αποστειρώνονταν όπως αναφέρεται παραπάνω.

2.5 Καθορισμός MNIC

Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 2.4 το επιλεκτικό μέσο με το οποίο έγινε η αξιολόγηση του υποθανάτιου τραυματισμού ήταν το TSAYE με προσθήκη NaCl. Η συγκέντρωση NaCl εξαρτάται μεταξύ άλλων και από τα στελέχη που χρησιμοποιούνται σε κάθε μελέτη και από την φάση των κυττάρων και καθορίζεται από μία σειρά πειραμάτων που έχουν ως στόχο την εύρεση του MNIC-maximum non inhibitory concentration, την μέγιστη συγκέντρωση ουσίας η οποία δεν αναστέλλει την αύξηση του μικροοργανισμού. Στόχος αυτών των πειραμάτων δηλαδή ήταν να βρεθεί για κάθε στέλεχος που θα χρησιμοποιούταν στις επόμενες μελέτες η μέγιστη συγκέντρωση NaCl η οποία δεν αναστέλλει την ανάπτυξη μη καταπονημένων κυττάρων ή κυττάρων φρέσκιας καλλιέργειας.

Για τον καθορισμό του MNIC, έγιναν πειράματα σε κλινές συγκεντρώσεως NaCl. Έγινε δειγματοληψία όγκου 100μl από εμβόλιο με κύτταρα μέσης στατικής φάσης για τα στελέχη EGD-e και ScottA. Επιστρώθηκαν τρυβλία TSAYE 0% NaCl, TSAYE 3% NaCl TSAYE 5% NaCl TSAYE 6% NaCl w/v. Τα τρυβλία χωρίς επιλεκτικό παράγοντα (TSAYE 0% NaCl) συγκρίνονται με τα αντίστοιχα τρυβλία με παρουσία NaCl. Στην παρούσα μελέτη, θεωρήσαμε ως MNIC την συγκέντρωση NaCl στην οποία παρατηρούνταν έως 10% λιγότερες αποικίες από τα αντίστοιχα τρυβλία χωρίς συγκέντρωση NaCl.

2.6. Παράγοντες καταπόνησης

Αναλυτικότερα, οι παράγοντες καταπόνησης και η πειραματική διαδικασία για κάθε περίπτωση παρουσιάζεται παρακάτω:

2.6.1. Γαλακτικό οξύ- Lactic Acid pH 3.0

Σε διάλυμα Ringer και Microcosm Water προστέθηκε γαλακτικό οξύ υπό ασηπτικές συνθήκες και υπό ανάδευση έως ότου το pH να είναι 3.0. Κατόπιν τα διαλύματα μοιράσθηκαν σε 16 πλαστικούς περιέκτες Falcon συνολικού όγκου 15ml (tubes), με κάθε περιέκτη να περιέχει 10ml διαλύματος. Ταυτόχρονα προετοιμάστηκε το εμβόλιο με τα κύτταρα μέσης στατικής φάσης *Listeria monocytogenes*. 100μl από το εμβόλιο κάθε στελέχους εμβολιάσθηκε σε κάθε δείγμα την χρονική στιγμή t_0 . Πιο συγκεκριμένα, το ScottA στέλεχος εμβολιάσθηκε σε διαλύματα Ringer και Microcosm σε δύο τεχνικές επαναλήψεις, και τα 4 δείγματα τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία 4°C. Αντίστοιχα εμβολιάσθηκαν 4 δείγματα και τοποθετήθηκαν στους 20°C. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για την παρασκευή των δειγμάτων που εμβολιάσθηκαν με κύτταρα του στελέχους EGD-e. Συνολικά υπήρχαν δηλαδή 16 δείγματα (εικόνα 2.2)

Την χρονική στιγμή t_0 λάμβανε χώρα η πρώτη δειγματοληψία. Με βάση προηγούμενα πειράματα καθώς και την βιβλιογραφία, καθορίστηκε η συχνότητα και οι αραιώσεις για τις επόμενες δειγματοληψίες. Για τα πειράματα στα οποία ο παράγοντας καταπόνησης είναι το γαλακτικό οξύ, pH 3, η δεύτερη δειγματοληψία, t_1 έγινε 4 ώρες μετά τον εμβολιασμό, η

τρίτη, t_2 , 8 ώρες μετά, η τέταρτη, t_3 , 24 ώρες μετά και η τελευταία δειγματοληψία, t_4 , 30 ώρες μετά τον εμβολιασμό.

Στα πειράματα όξινης καταπόνησης, είναι σημαντικό το pH των διαλυμάτων παρακολουθείται στην πάροδο του χρόνου, ιδιαίτερα αν ο διαλύτης δεν έχει ρυθμιστικές ιδιότητες. Τέτοιο μέσο είναι και το Microcosm. Για αυτό τον λόγο, έπειτα από κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν, υπό ασηπτικές συνθήκες από κάθε δείγμα, ποσότητα διαλύματος του οποίου το pH μετρούνταν και καταγράφονταν.

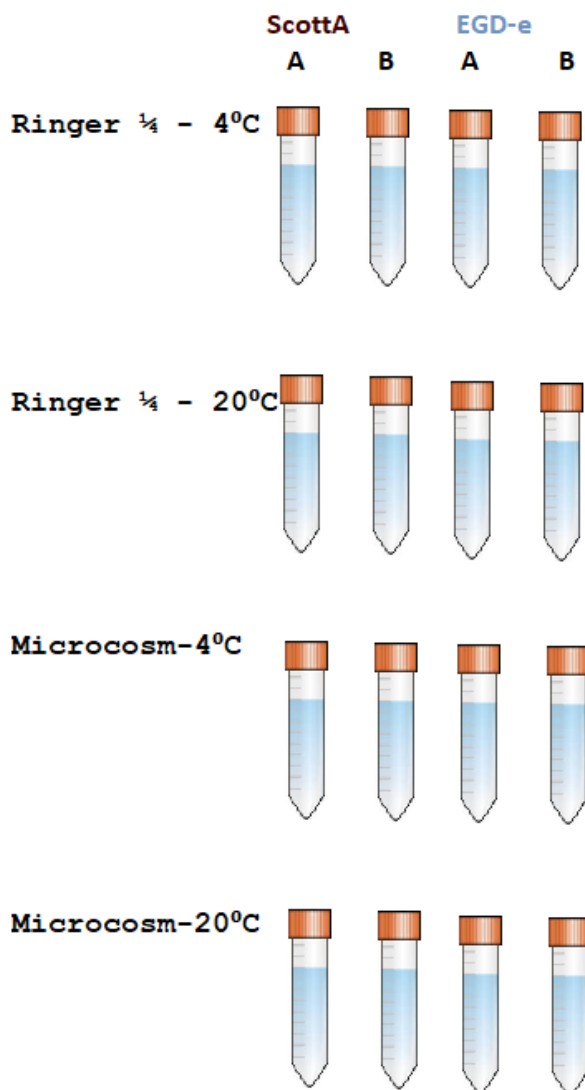
2.6.2. Benzalkonium Chloride $c=10^{-3}$ $\mu\text{g/ml}$, 10ppm

Πυκνό Benzalkonium Chloride (BC) ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας και διαλύθηκε σε διάλυμα Ringer και Microcosm και αναδεύτηκε δημιουργώντας ένα πυκνό stock solution συγκέντρωσης 500ppm = $5 \cdot 10^{-2}$ $\mu\text{g/ml}$. Τα διαλύματα αραιώθηκαν εκ νέου με Ringer και Microcosm αντίστοιχα έως ότου επιτευχθεί η τελική συγκέντρωση $c=10^{-3}$ $\mu\text{g/ml}$ (working solution). Έπειτα από ανάδευση, τα διαλύματα αυτά μοιράστηκαν σε 16 πλαστικούς περιέκτες συνολικού όγκου 15ml (tubes), με κάθε περιέκτη να περιέχει 10ml διαλύματος.

Ταυτόχρονα προετοιμάστηκε το εμβόλιο με τα κύτταρα μέσης στατικής φάσης *Listeria monocytogenes*. 100μl από το εμβόλιο κάθε στελέχους εμβολιάστηκε σε κάθε δείγμα την χρονική στιγμή t_0 . Συνολικά υπήρχαν 16 δείγματα, τα οποία αντιστοιχούν σε δύο στελέχη, επώαστηκαν στις προαναφερθείσες θερμοκρασίες, 4°C και 20°C, σε δύο μέσα και κάθε περίπτωση εμβολιάστηκε δύο φορές (Εικόνα 2.2).

Την χρονική στιγμή t_0 έλαβε χώρα η πρώτη δειγματοληψία, ενώ ακολούθησαν οι επόμενες στις χρονικές στιγμές $t_1=1\text{h}$, $t_2=2\text{h}$, $t_3=4\text{h}$, $t_4=6\text{h}$ μετά τον εμβολιασμό.

Στην εικόνα 2.2, παρουσιάζεται η διάταξη των δειγμάτων, το στέλεχος, το διάλυμα, η επανάληψη και η θερμοκρασία επώασης του μικροοργανισμού.



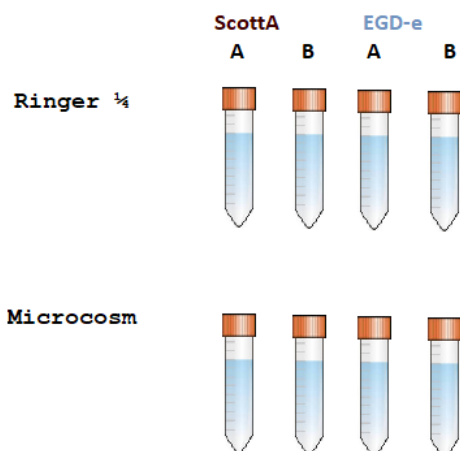
Εικόνα2.2: Διαγραμματική απεικόνιση των δειγμάτων. Δύο στελέχη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* εμβολιάζονται σε δύο μέσα με Lactic acid pH 3.0 ή BC,10ppm και διατηρούνται σε δύο θερμοκρασίες. Το πείραμα λαμβάνει χώρα σε δύο τεχνικές επαναλήψεις.

2.6.3 Έκθεση σε θερμοκρασία 55 °C

Διαλύματα Ringer και Microcosm Water μοιράσθηκαν σε 8 πλαστικούς περιέκτες falcon όγκου 15ml (tubes), με κάθε περιέκτη να περιέχει 10ml διαλύματος και τοποθετήθηκαν στους 55°C. Ταυτόχρονα προετοιμάστηκε το εμβόλιο με τα κύτταρα μέσης στατικής φάσης *Listeria monocytogenes* και σε κάθε περιέκτη εμβολιάσθηκαν 100μl δημιουργώντας 8 δείγματα την χρονική στιγμή t_0 .

Την χρονική στιγμή t_0 έλαβε χώρα η πρώτη δειγματοληψία, ενώ ακολούθησαν οι επόμενες στις χρονικές στιγμές $t_1=30\text{min}$, $t_2=60\text{min}$, $t_3=4\text{h}$, $t_4=90$ και $t_5=120\text{min}$ μετά τον εμβολιασμό. Σε κάθε δειγματοληψία οι περιέκτες τύπου Eppendorf με διάλυμα Ringer, στους οποίους εισάγονταν το δείγμα με σκοπό να γίνουν οι δεκαδικές αραιώσεις, τοποθετούνταν σε πάγο ώστε να σταματήσει η επίδραση της καταπόνησης στην δεδομένη στιγμή.

Στην εικόνα 2.3 παρουσιάζεται η διάταξη των δειγμάτων, το στέλεχος, το διάλυμα, η επανάληψη και η θερμοκρασία επώασης του μικροοργανισμού.



Εικόνα2.3: Διαγραμματική απεικόνιση των δειγμάτων. Δύο στελέχη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* εμβολιάζονται σε δύο μέσα τα οποία έχουν θερμανθεί στους 55οC. Το πείραμα λαμβάνει χώρα σε δύο τεχνικές επαναλήψεις.

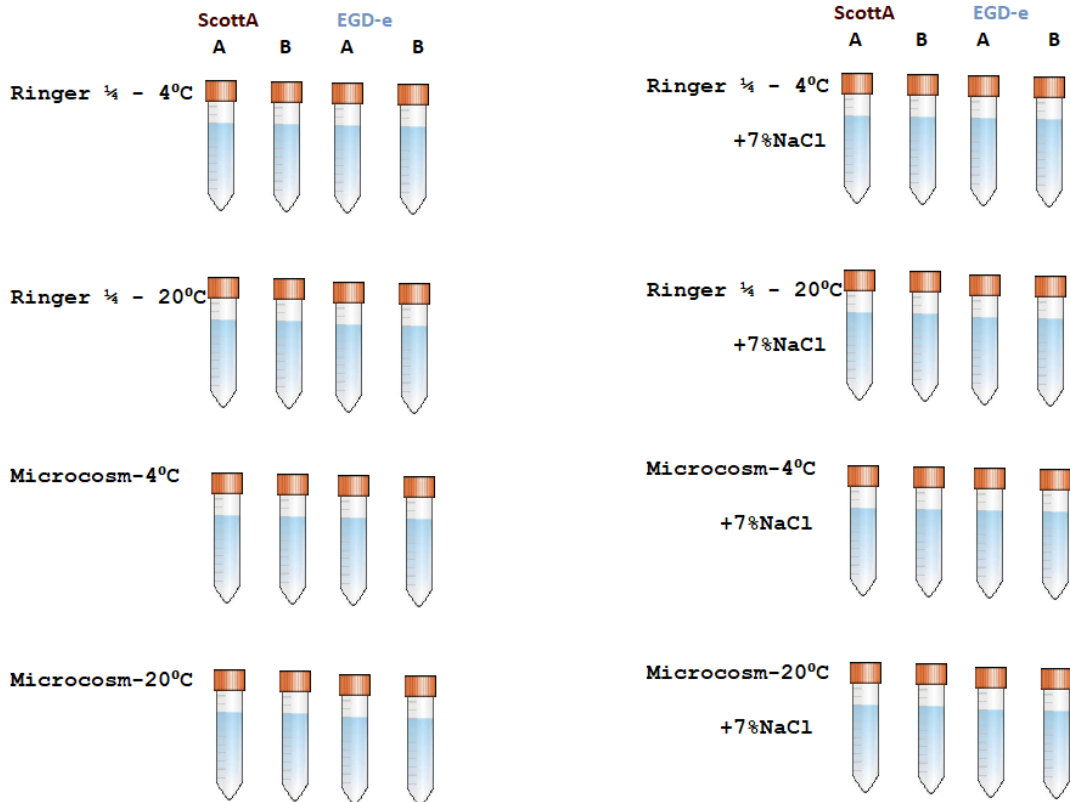
2.6.4. Λιμός- Starvation και ωσμωτική καταπόνηση

Σε διάλυμα Ringer και Microcosm προστέθηκε χλωριούχο νάτριο-NaCl και ακολούθησε ογκομέτρηση, ώστε η τελική περιεκτικότητα του διαλύματος σε αλάτι να είναι 7% w/v. Κατόπιν, τα παρασκευάσματα θερμάνθηκαν στους 121°C για 30 λεπτά.

Τα διαλύματα αυτά μοιράσθηκαν σε 16 πλαστικούς περιέκτες συνολικού όγκου 15ml (tubes). Επιπλέον, διαλύματα Ringer και Microcosm, τα οποία δεν περιείχαν άλας, μοιράσθηκαν σε 16 πλαστικούς περιέκτες falcon όγκου 15ml (tubes), με κάθε περιέκτη να περιέχει 10ml διαλύματος. Ταυτόχρονα προετοιμάστηκε το εμβόλιο με τα κύτταρα μέσης στατικής φάσης *Listeria monocytogenes* και σε κάθε περιέκτη εμβολιάσθηκαν 100μl δημιουργώντας 32 δείγματα την χρονική στιγμή t_0 . Τα δείγματα ήταν σε διπλέτα και περιλαμβάνουν δύο στελέχη, δύο θερμοκρασίες, δύο μέσα, παρουσία και απουσία άλατος. Αναλυτικότερα τα δείγματα παρουσιάζονται στην εικόνα 2.4.

Η πρώτη δειγματοληψία έλαβε χώρα την χρονική στιγμή t_0 , η δεύτερη μία ημέρα μετά και για διάστημα δύο μηνών οι δειγματοληψίες γίνονταν μία φορά την εβδομάδα. Σε κάποια δείγματα, υπήρξε ανάγκη για συχνότερες δειγματοληψίες.

Για να παρακολουθείται το pH των διαλυμάτων, παρασκευάστηκαν και μετρούνταν παράλληλα διαλύματα με Ringer και Microcosm, τα οποία επώαζονταν στις θερμοκρασίες ενδιαφέροντος τα οποία δεν ήταν όμως εμβολιασμένα με τον μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*.



Εικόνα2.4: Διαγραμματική απεικόνιση των δειγμάτων. Δύο στελέχη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* εμβολιάζονται σε δύο μέσα και διατηρούνται σε δύο θερμοκρασίες. Το πείραμα λαμβάνει χώρα σε δύο τεχνικές επαναλήψεις. Τα ίδια δείγματα προετοιμάζονται με 7%NaCl.

2.7 Ανάλυση των αποτελεσμάτων

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σε κάθε δειγματοληψία, δείγμα κυττάρων επιστρώνονται σε επιλεκτικά και μη επιλεκτικά υποστρώματα. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C για 2 και πέντε ημέρες αντίστοιχα και έπειτα οι ορατές αποικίες μετρούνται. Από τον αριθμό των αποικιών κάθε τρυβλίου εκτιμάται ο πληθυσμός του δείγματος την στιγμή της δειγματοληψίας, με τον τύπο:

$$\text{Log(CFU/ml)} = \text{Log}\left(\frac{\text{CFU} * \text{Dilution Factor}}{\text{ml}}\right) \quad \text{(Τύπος2)}$$

Από κάθε τεχνική και βιολογική επανάληψη υπολογίζεται ο μέσος όρος του εκτιμώμενου πληθυσμού ανά αλατότητα και χρονικό σημείο. Οι τιμές αυτές χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της καμπύλης μείωσης για κάθε συνδυασμό στελέχους, θερμοκρασίας και μέσου επώασης.

Για τον υπολογισμό του υποθανάτιου τραυματισμού ανά δείγμα, για κάθε τεχνική και βιολογική επανάληψη ο εκτιμώμενος πληθυσμός από τα τρυβλία με το μη επιλεκτικό μέσο συγκρίθηκε με τον εκτιμώμενο πληθυσμό από τα αντίστοιχα τρυβλία με το επιλεκτικό μέσο. Από τον τύπο 1, βρίσκουμε το ποσοστό του τραυματισμού:

$$\% \text{sublethal injury} = \left(1 - \frac{\text{counts on selective media}}{\text{counts on nonselective media}}\right) * 100$$

(Τύπος1)

Από τον μέσο όρο του %τραυματισμού κάθε τεχνικής και βιολογικής επανάληψης βρίσκεται ο %τραυματισμός του δείγματος για το δεδομένο χρονικό σημείο. Αυτό επαναλαμβάνεται για όλα τα χρονικά σημεία και προκύπτει έτσι ανά πειραματική συνθήκη ο τραυματισμός για κάθε χρονική στιγμή. Από τις τιμές αυτές κατασκευάζεται η καμπύλη που δείχνει τον τραυματισμό σε συνάρτηση με τον χρόνο για κάθε συνδυασμό στελέχους, θερμοκρασίας και μέσου επώασης. Ο υποθανάτιος τραυματισμός εκφράζεται ως ποσοστό τραυματισμένων κυττάρων σε ένα δείγμα.

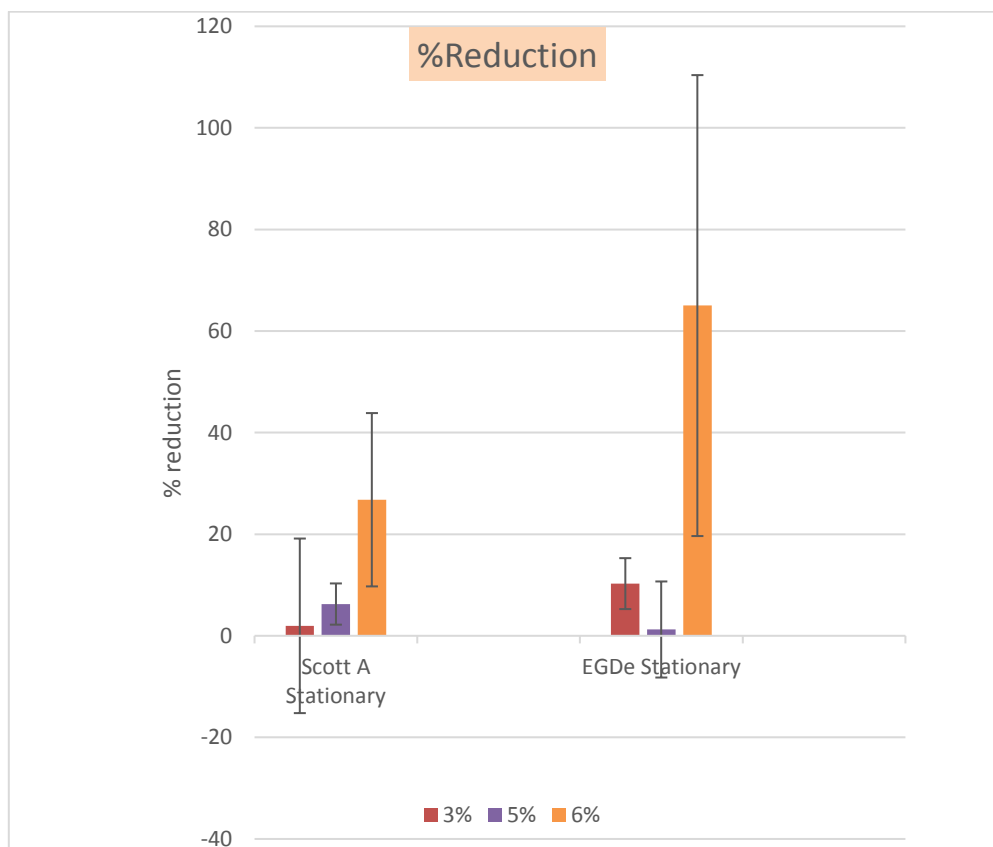
Για την αξιολόγηση του υποθανάτιου τραυματισμού θέτουμε μία τιμή-όριο (threshold) κάτω από την οποία η διαφορά ανάμεσα στα επιλεκτικά και μη επιλεκτικά μέσα αναφορικά με τον προσδιορισμό του πληθυσμιακού μεγέθους θεωρείται αποτέλεσμα της παραλλακτικότητας μεταξύ των πειραμάτων. Διαφορά μεγαλύτερη από αυτήν την τιμή, θεωρείται υποθανάτιος τραυματισμός. Η τιμή 30% τίθεται ως αυτό το όριο (Olszewska et.al., 2016).

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε ανάλυση διακύμανσης (2wayANOVA, $\alpha=0.05$, $p<0.05$) των μέσων όρων για τα δείγματα που συγκρίνονταν κάθε φορά. Το κριτήριο της ανάλυσης ήταν το Tuckey-HSD. Για να βρεθεί εάν ο τραυματισμός που παρατηρείται σε ένα δείγμα είναι στατιστικά σημαντικός, χρησιμοποιήθηκε το students t-test (Mann-Whitney test, $p<0.05$). Για να βρεθεί εάν η διαφορά μεταξύ δύο συνθηκών είναι σημαντική, χρησιμοποιήθηκε ξανά το students t-test (Wilcoxon matched-pairs signed rank test). Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Graphpad Prism 7.04.

3.Αποτελέσματα

3.1 Καθορισμός MNIC (Maximum non inhibitory concentration) στα στελέχη ScottA και EGD-e του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* στην στατική φάση ανάπτυξης.

Για τον καθορισμό του MNIC, έγιναν πειράματα σε κλινές συγκεντρώσεως NaCl. Όγκος 100μl λήφθηκε για κάθε στέλεχος από αρχικό εμβόλιο 10^9 CFU/ml. Οι συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν αρχικά ήταν 0%, 3%, 5%, 6%, 7% NaCl w/v. Τα τρυβλία με TSAYE+0% NaCl χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα για την ποσοτικοποίηση της απώλειας καλλιεργησιμότητας εξ αιτίας της αυξημένης συγκέντρωσης άλατος. Από τον αριθμό των αποικιών στα τρυβλία κάθε αλατότητας υπολογίζεται ο πληθυσμός των βακτηρίων του δείγματος. Κάθε αλατότητα συγκρίνεται με την αντίστοιχη περίπτωση TSAYE+0%NaCl και βρίσκεται η % μείωση του υπολογιζόμενου πληθυσμού. Ως MNIC επιλέγεται η μέγιστη συγκέντρωση άλατος στην οποία παρατηρείται έως και 10% απώλεια καλλιεργησιμότητας λόγω αναστολής. Η % μείωση υπολογίζεται με τον τύπο1 (Κεφάλαιο 2.7-Υλικά και Μέθοδοι).

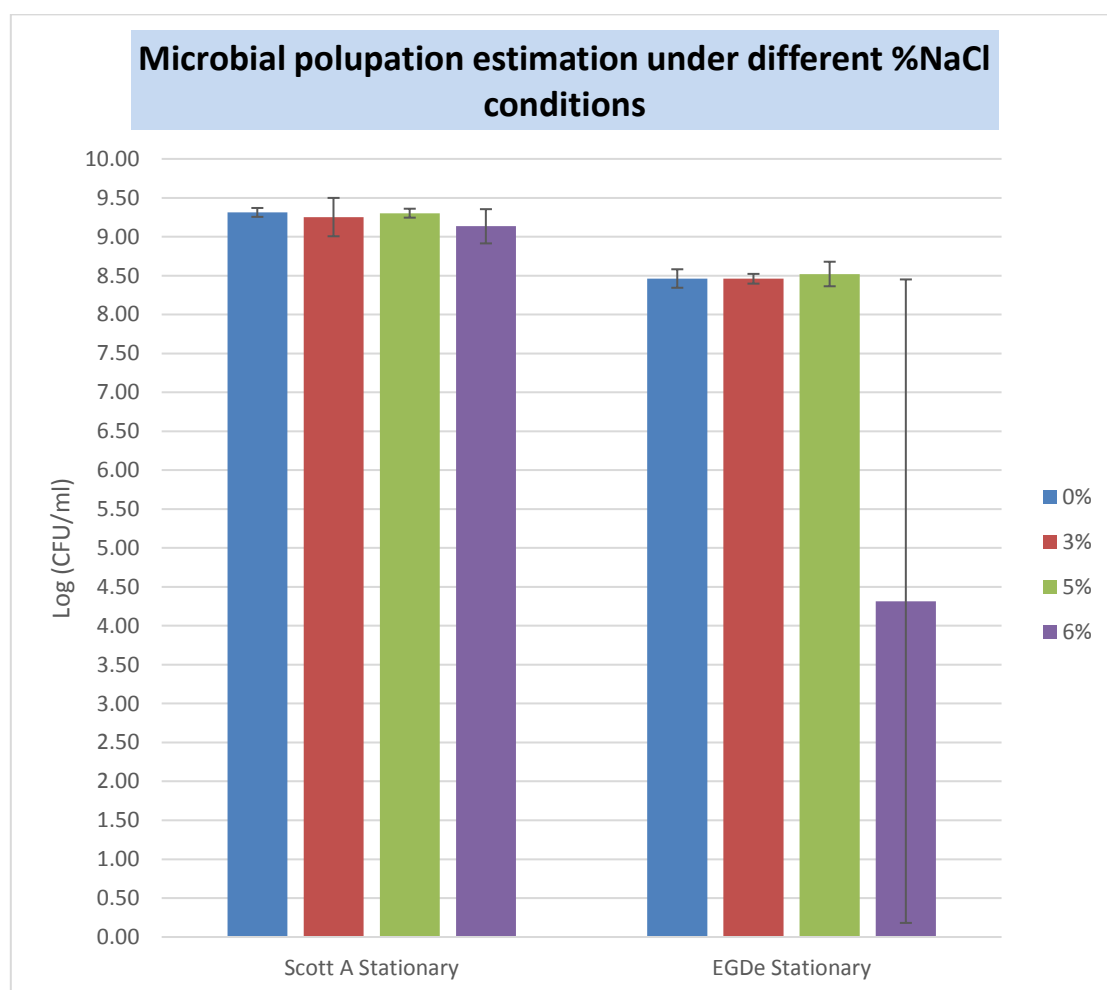


Γράφημα 3.1: Η % μείωση της καλλιεργησιμότητας για κάθε αλατότητα στα δύο στελέχη *Listeria monocytogenes*.

Η δοκιμή με την συγκέντρωση NaCl 7% έδωσε απώλεια καλλιεργησιμότητας 100% και δεν παρουσιάζεται στα γραφήματα. Στο στέλεχος ScottA, η συγκέντρωση άλατος 5% παρουσίασε μείωση καλλιεργησιμότητας συγκριτικά με το θρεπτικό με απουσία άλατος κατά 6,25% ενώ

η συγκέντρωση 6% κατά 26,79%. Στο στέλεχος EGD-e, η μέγιστη συγκέντρωση NaCl στην οποία παρατηρείται διαφορά του εκτιμώμενου πληθυσμού έως 10% συγκριτικά με το control, ήταν το 5% NaCl, με μείωση 1,24%.

Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζεται η εκτίμηση του αρχικού βακτηριακού πληθυσμού για κάθε στέλεχος και συγκέντρωση άλατος. Στην συγκέντρωση 6% NaCl είναι εμφανής η απώλεια καλλιεργησιμότητας του βακτηρίου εξ αιτίας της ανασταλτικής δράσης του άλατος, Δηλαδή, εάν αυτή η συγκέντρωση επιλέγονταν ως MNIC, θα ήταν ακαθόριστο εάν η διαφορά στον εκτιμώμενο μικροβιακό πληθυσμό οφείλεται σε τραυματισμό ή στην αυξημένη συγκέντρωση άλατος που δεν επιτρέπει ακόμη και σε υγιή κύτταρα να σχηματίσουν αποικίες.



Γράφημα 3.2:Υπολογιζόμενος πληθυσμός κυττάρων *Listeria monocytogenes* για την κάθε αλατότητα.

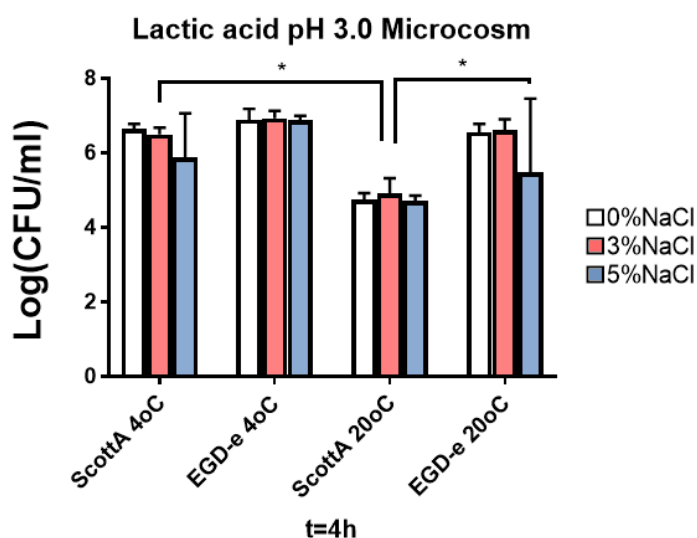
Με βάση τα παραπάνω, η συγκέντρωση 5%NaCl επιλέχθηκε ως MNIC και δια τα δύο στελέχη *Listeria monocytogenes*.

3.2 Αξιολόγηση του υποθανάτιου τραυματισμού στα στελέχη ScottA και EGD-e του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* έπειτα από όξινη καταπόνηση.

Στα μέσα Ringer και Microcosm το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 3.0 με χρήση γαλακτικού οξέος. Έτσι δημιουργήθηκε όξινο περιβάλλον για τα στελέχη *Listeria monocytogenes* τα οποία εμβολιάστηκαν στα μέσα και αμέσως μετά επώαστηκαν στις θερμοκρασίες 4 °C και 20 °C. Η έκθεση στην καταπόνηση διήρκεσε 30 ώρες, διάστημα στο οποίο έλαβαν χώρα 5 δειγματοληψίες, t0=0h, t1=4h, t2=8h, t3=24h και t4=30h.

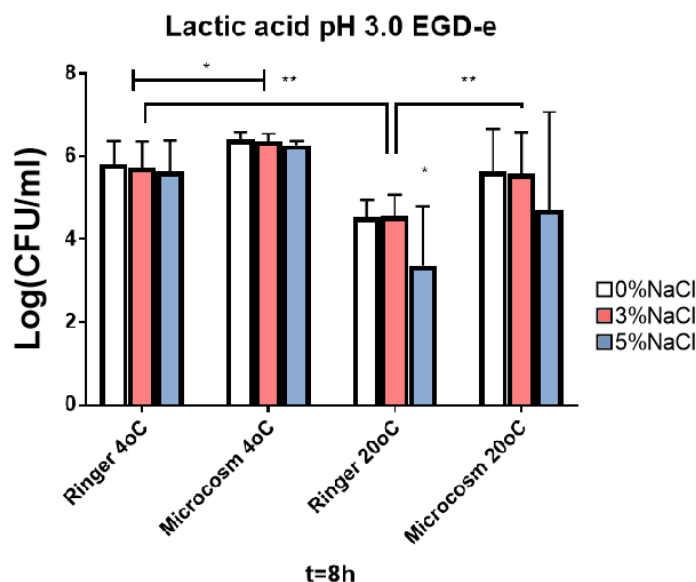
Στην χρονική στιγμή t=0 τα δείγματα παρουσίασαν είτε μηδενικό είτε μη στατιστικά σημαντικό τραυματισμό. Στον Πίνακα1 του Υπομνήματος παρουσιάζεται για όλα τα δείγματα σε κάθε χρονική στιγμή η παρουσία ή απουσία στατιστικά σημαντικού τραυματισμού. Σε κανένα δείγμα δεν παρατηρήθηκε απότομη μείωση του βακτηριακού πληθυσμού την στιγμή της έκθεσης στην καταπόνηση, γεγονός που πιθανώς υποδεικνύει ότι στις συγκεκριμένες συνθήκες το γαλακτικό οξύ pH 3.0 δεν προκαλεί σοκ στα κύτταρα *Listeria monocytogenes*.

Στην στιγμή t=4h, τα δείγματα που επώαζονταν σε Ringer στους 4 °C εμφάνισαν σημαντικό τραυματισμό, σε ποσοστά 42,6% στο στέλεχος ScottA και 53,6% στο EGD-e, ενώ τα δείγματα Microcosm του στελέχους EGD-e μηδενικό ή μη σημαντικό (Πίνακας1-Υπόμνημα). Στα δείγματα που επώαζονταν σε Ringer, με ανάλυση 3wayANOVA, δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δείγματα, ανεξαρτήτως στελέχους και θερμοκρασίας επώασης. Αντίθετα, στο μέσο Microcosm η μεταβλητότητα που παρατηρήθηκε οφείλονταν τόσο στα διαφορετικά στελέχη όσο και στις θερμοκρασίες επώασης. Και στις δύο θερμοκρασίες βρέθηκαν διαφορές ανάμεσα στα δείγματα οι οποίες οφείλονται στο μέσο επώασης και στο στέλεχος. Στο στέλεχος EGD-e, η μεταβλητότητα ανάμεσα στα δείγματα οφείλεται στην θερμοκρασία και στο ScottA στο μέσο επώασης και στην θερμοκρασία (Γράφημα 3.3)

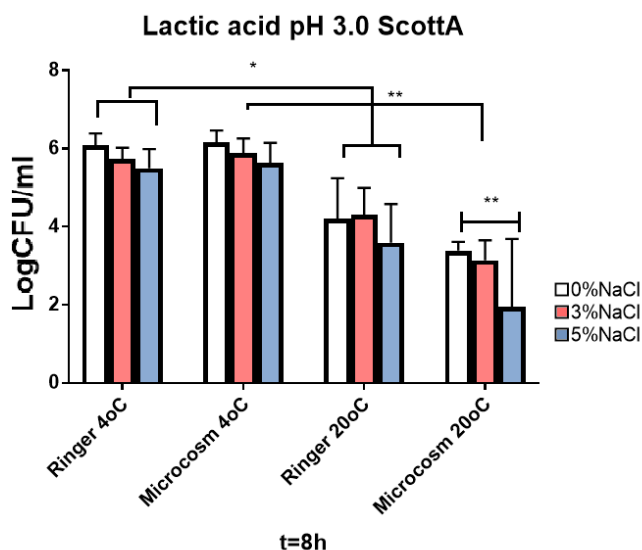


Γράφημα 3.3 :Επιβίωση και υποθανάτιος τραυματισμός κυττάρων *Listeria monocytogenes* στην 4^η ώρα έκθεσης σε γαλακτικό οξύ, pH 3.0 στο μέσο Microcosm. Με * υποδηλώνονται σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε διαφορετικές ομάδες.

Στην χρονική στιγμή $t=8h$, παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δείγματα που επωάζονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες (Γράφημα 3.4a, 3.4.b) Στο στέλεχος ScottA παρουσιάζονται διαφορές στην επιβίωση και στον τραυματισμό μεταξύ των διαφορετικών θερμοκρασιών αλλά όχι μεταξύ των μέσων (Γράφημα 3.4b). Στο στέλεχος EGD-e υπήρχε διαφορά ανάμεσα στα δείγματα που επωάστηκαν τόσο σε διαφορετικά μέσα όσο και σε διαφορετικές θερμοκρασίες (Γράφημα 3.4a).

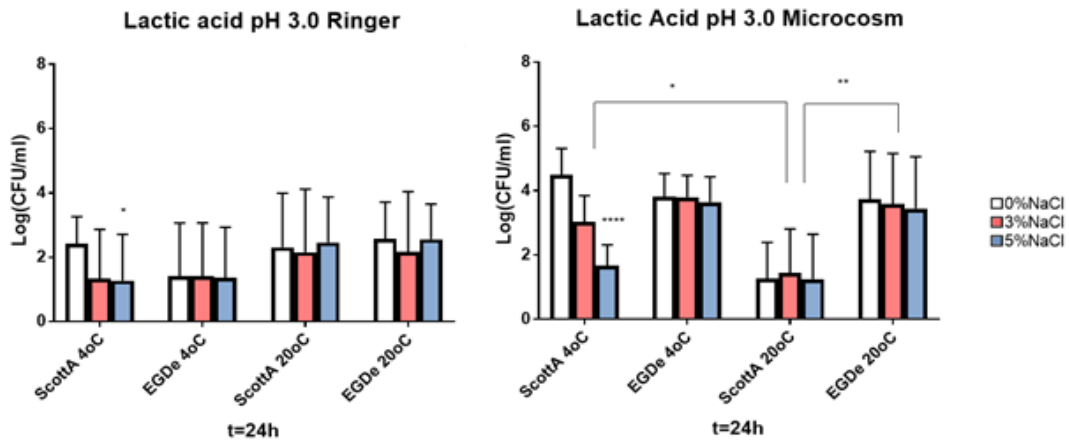


Γράφημα 3.4a :Επιβίωση και υποθανάτιος τραυματισμός κυττάρων *Listeria monocytogenes* στην 8^η ώρα έκθεσης σε γαλακτικό οξύ, pH 3.0 στο στέλεχος EGD-e. Με * υποδηλώνονται σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε διαφορετικές ομάδες.

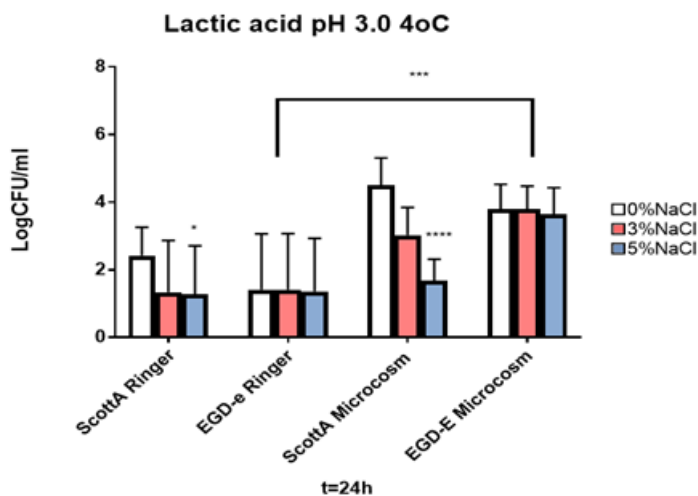


Γράφημα 3.4b :Επιβίωση και υποθανάτιος τραυματισμός κυττάρων *Listeria monocytogenes* στην 8^η ώρα έκθεσης σε γαλακτικό οξύ, pH 3.0 στο στέλεχος ScottA. Με * και ** υποδηλώνονται σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε διαφορετικές ομάδες.

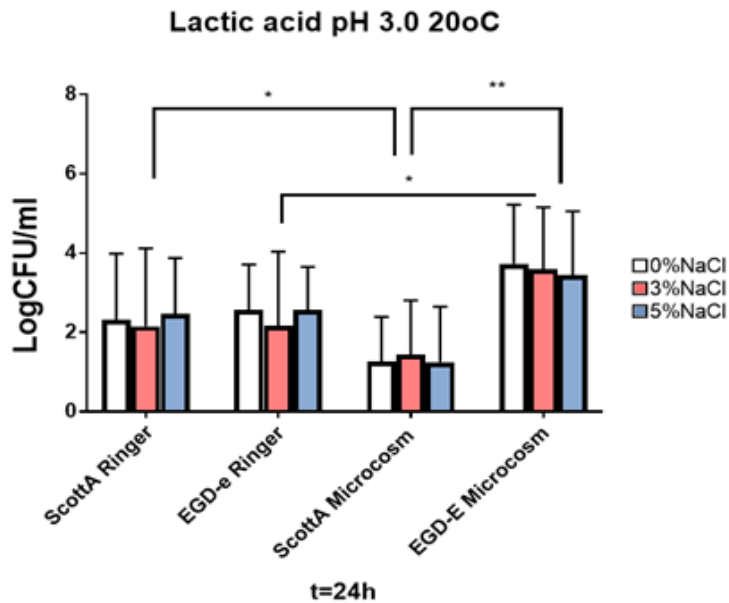
Στην χρονική στιγμή t=24h, το μέσο επώασης καθόρισε την επιβίωση και τον τραυματισμό στα δείγματα στους 4 °C (γράφημα 3.7), ενώ στους 20 °C παρατηρείται στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δύο μέσα επώασης και ανάμεσα στα στελέχη, όταν τα κύτταρα επώαστηκαν στο μέσο Microcosm. (Γράφημα 3.8). Παρατηρούμε ότι το στέλεχος ScottA στους 4 °C παρουσιάζει στατιστικά σημαντικό τραυματισμό και στα δύο μέσα (Γράφημα 3.5 και 3.6).



Γράφημα 3.5 και 3.6 :Επιβίωση και υποθανάτιος τραυματισμός κυττάρων *Listeria monocytogenes* στην 24^η ώρα έκθεσης σε γαλακτικό οξύ, pH 3.0 σε μέσο Ringer (αριστερά) και Microcosm (δεξιά).

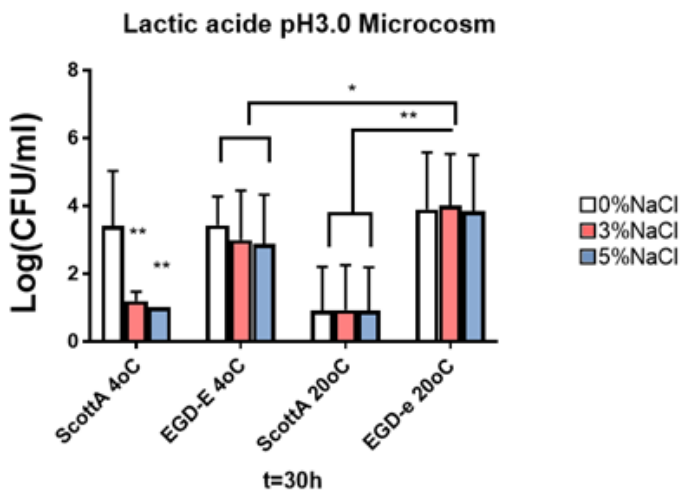


Γράφημα 3.7 :Επιβίωση και υποθανάτιος τραυματισμός κυττάρων *Listeria monocytogenes* στην 24^η ώρα έκθεσης σε γαλακτικό οξύ, pH 3.0 σε θερμοκρασία 4 °C.



Γράφημα 3.8 :Επιβίωση και υποθανάτιος τραυματισμός κυττάρων *Listeria monocytogenes* στην 24^η ώρα έκθεσης σε γαλακτικό οξύ, pH 3.0 σε θερμοκρασία 20 °C.

Έπειτα από 30 ώρες έκθεσης σε όξινο περιβάλλον, στο μέσο Microcosm εντοπίζεται στατιστικά σημαντικός τραυματισμός στο στέλεχος ScottA στους 4°C, αλλά και στατιστικά σημαντικές διαφορές στο στέλεχος EGD-e ανάμεσα στις δύο θερμοκρασίες επώασης και στους 20 °C ανάμεσα στα δύο στελέχη (γράφημα 3.9)

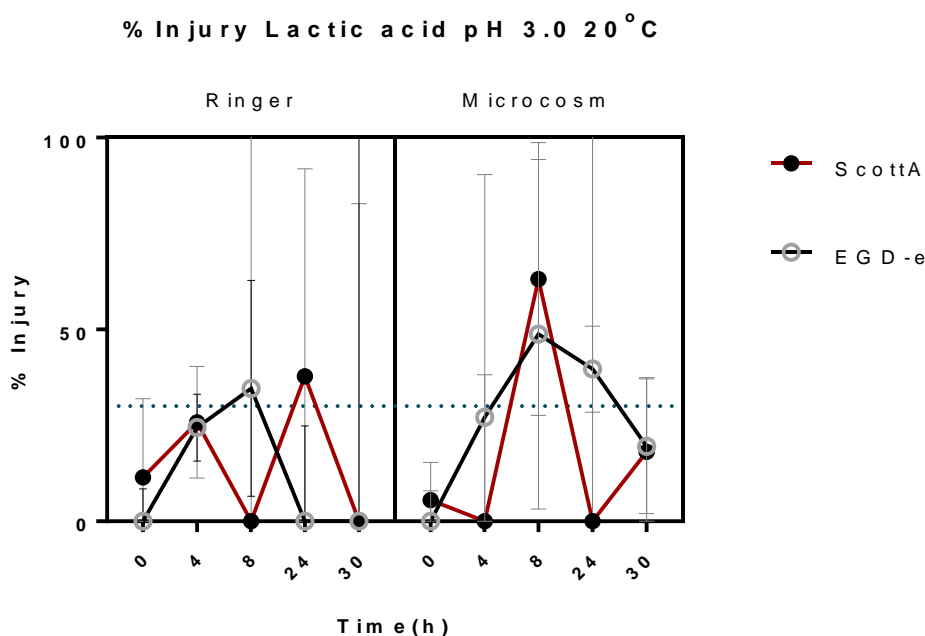


Γράφημα 3.9. Επιβίωση και υποθανάτιος τραυματισμός κυττάρων *Listeria monocytogenes* σε μέσο Microcosm έπειτα από έκθεση σε γαλακτικό οξύ pH 3.0 για 30h . Με * και ** υποδηλώνονται σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε διαφορετικές ομάδες,

Ο τραυματισμός των κυττάρων *Listeria monocytogenes* διαφέρει για δεδομένο συνδυασμό στελέχους, θερμοκρασίας και μέσου, παρατηρούνται ωστόσο σαφείς ομοιότητες σε ορισμένες περιπτώσεις. Στο Microcosm στους 4 °C και στα δύο στελέχη παρατηρείται ότι ο

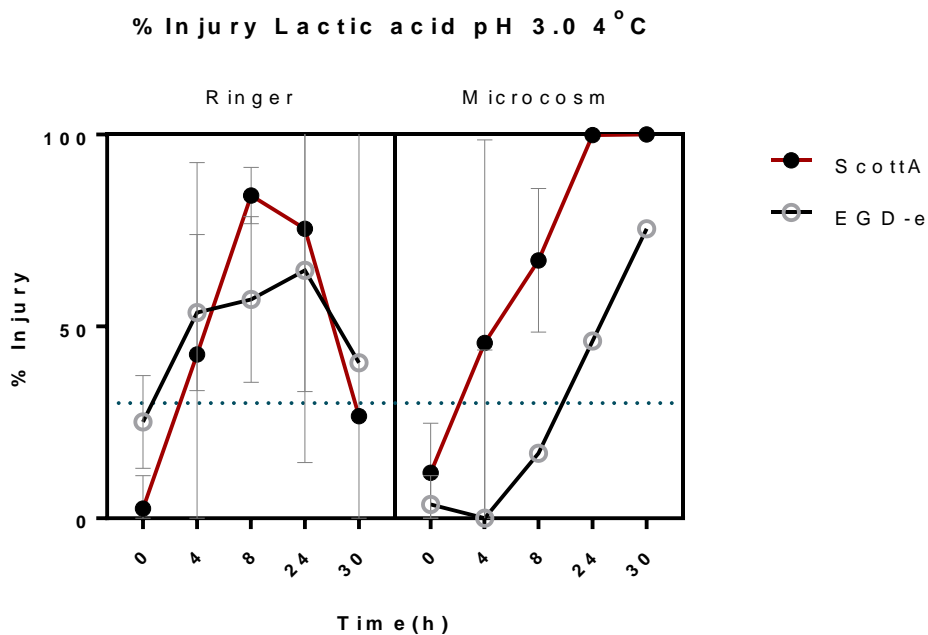
τραυματισμός αυξάνεται όσο αυξάνεται και η έκθεση των κυττάρων στον παράγοντα καταπόνησης.

Στους 20 °C ο τραυματισμός έφτασε το 63,1% στο δείγμα ScottA Microcosm 20 °C στις 8 ώρες έκθεσης στην καταπόνηση, αυτή ήταν ωστόσο η εντονότερη ένδειξη τραυματισμού στα δείγματα αυτής της θερμοκρασίας. Τα δύο στελέχη ομοιάζουν στον τραυματισμό που παρουσιάζουν υπό την έννοια ότι στο Ringer, τόσο το στέλεχος ScottA όσο και το EGD-e παρουσίασαν τραυματισμό κάτω του ορίου του 30% στην αρχική έκθεση στο όξινο περιβάλλον. Ο τραυματισμός αυξάνεται έως τις 4 και τις 8 ώρες αντίστοιχα και κατόπιν μηδενίζεται στο επόμενο χρονικό σημείο, αυξάνεται ξανά στην περίπτωση του ScottA και ισούται με 0% στην τελευταία μέτρηση του πειράματος (Γράφημα 3.10). Στο Microcosm, τα δύο στελέχη έχουν αρχικό μη σημαντικό τραυματισμό, ο οποίος μεγιστοποιείται στις 8 ώρες και είναι μειωμένος στο τέλος των μετρήσεων, εμφανίζοντας τραυματισμό κάτω από 30% (Γράφημα 3.10).



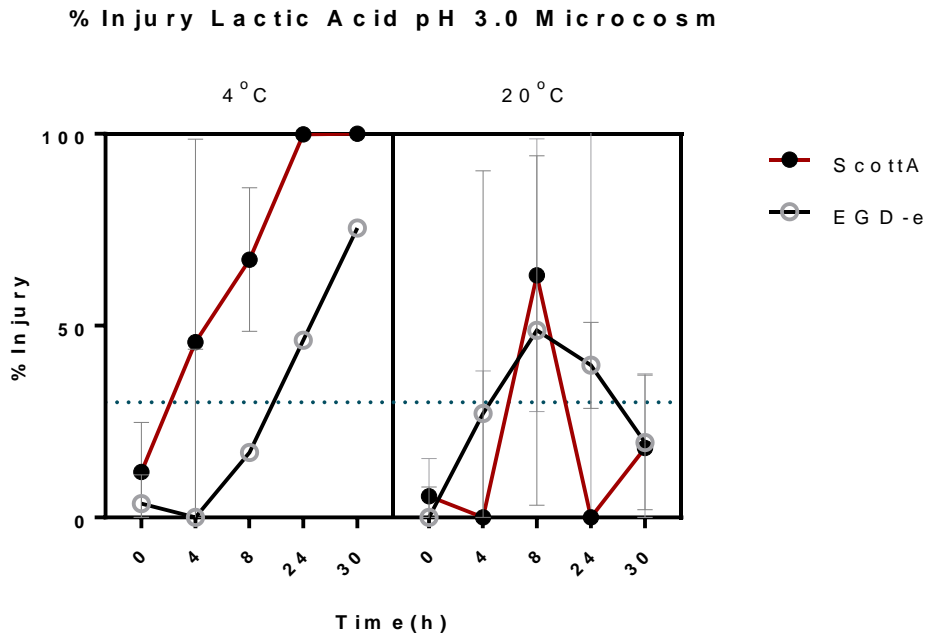
Γράφημα 3.10. Ο τραυματισμός δύο στελεχών *Listeria monocytogenes* εκπεφρασμένος ως ποσοστό τραυματισμένων κυττάρων στον συνολικό πληθυσμό.

Στους 4°C ο τραυματισμός είναι πιο εκτεταμένος σε κάθε περίπτωση από τα αντίστοιχα δείγματα στους 20°C . Τα δείγματα του ScottA είναι τραυματισμένα κατά 100% στο μέσο Microcosm έπειτα από 24 ώρες έκθεσης στο όξινο περιβάλλον, ο υποθανάτιος τραυματισμός αυξάνεται με την έκθεση στον παράγοντα καταπόνησης και στα δύο στελέχη στο μέσο Microcosm. Το στέλεχος EGD-e έχει τραυματιστεί κατά 75,4% έπειτα από 30 ώρες σε όξινο περιβάλλον σε αυτό το μέσο. Ο τραυματισμός για κάθε στέλεχος διαφέρει από μέσο σε μέσο. Στο Ringer, ο τραυματισμός είναι αυξάνεται και είναι μέγιστος στις 8 ώρες έκθεσης για το ScottA (84,1%) και στις 24 ώρες για το EGD-e (64,6%) και εν συνεχεία μειώνεται. (Γράφημα 3.11).



Γράφημα 3.11: Ο τραυματισμός δύο στελεχών *Listeria monocytogenes* στους 4 °C εκπεφρασμένος ως ποσοστό τραυματισμένων κυττάρων στον συνολικό πληθυσμό.

Στο γράφημα 3.12 παρουσιάζεται καλύτερα η σύγκριση του τραυματισμού στις δύο θερμοκρασίες. Βλέπουμε ότι στο μέσο Microcosm, τα δείγματα στους 4 °C παρουσιάζουν περισσότερο τραυματισμό συγκριτικά με τους 20 °C. Στους 4 °C ο τραυματισμός αυξάνεται όσο αυξάνεται η έκθεση των κυττάρων στην καταπόνηση αλλά ο πληθυσμός των κυττάρων μένει σχετικά σταθερός και υψηλός σε ορισμένες περιπτώσεις. Στους 20 °C ο τραυματισμός είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερος αλλά ομοίως ο πληθυσμός των κυττάρων μένει σχετικά σταθερός (Γράφημα 3.9 και 3.12).



Γράφημα 3.12: Ο τραυματισμός δύο στελεχών *Listeria monocytogenes* στο μέσο Microcosm εκπεφρασμένος ως ποσοστό τραυματισμένων κυττάρων στον συνολικό πληθυσμό.

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η επιβίωση και ο τραυματισμός του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* όταν εκτίθενται σε όξινη καταπόνηση από γαλακτικό οξύ, pH 3.0 εξαρτάται από το μέσο, την θερμοκρασία και τα στελέχη που μελετώνται. Ιδιαίτερα το μέσο επώασης φάνηκε ότι καθορίζει την συμπεριφορά των κυττάρων. Ενδιαφέρον ήταν επίσης ότι σε διαφορετικούς χρόνους έκθεσης στην καταπόνηση, διαφορετικός παράγοντας φάνηκε να είναι ο πλέον σημαντικός για τον τραυματισμό των κυττάρων. Για παράδειγμα, στις 4h έκθεσης σε όξινο περιβάλλον, βρέθηκε σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δείγματα που επώαζονταν σε διαφορετικά μέσα αναφορικά με τον τραυματισμό. Στις 8h ίδια παρατήρηση ισχύει για τα δείγματα που επώαζονταν σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

3.3. Αξιολόγηση του υποθανάτιου τραυματισμού στα στελέχη ScottA και EGD-e του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* έπειτα από έκθεση στον απολυμαντικό παράγοντα Benzalkonium Chloride.

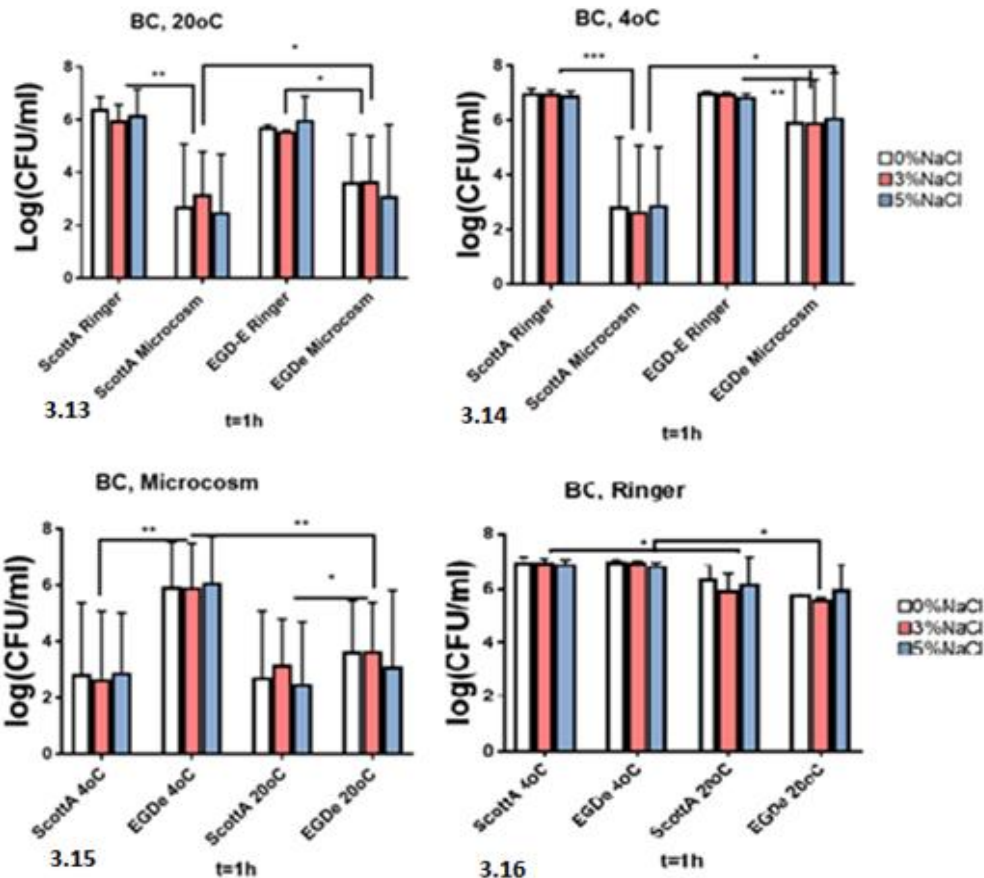
Benzalkonium Chloride συγκέντρωσης 10^{-3} μg/ml (10ppm) διαλύθηκε στα μέσα Ringer1/4 και Microcosm. Το pH των δειγμάτων παρέμεινε στην τιμή 7.0 σε όλη την διάρκεια των πειραμάτων. Τα μέσα εμβολιάστηκαν και με τα δύο στελέχη *Listeria monocytogenes* και επώαστηκαν στους 4°C και 20°C. Η έκθεση στην καταπόνηση διήρκησε 6 ώρες, διάστημα στο οποίο έλαβαν χώρα 5 δειγματοληψίες, t0=0h, t1=1h, t2=2h, t3=4h και t4=6h.

Τα δείγματα του μέσου Microcosm είχαν μείωση του βακτηριακού πληθυσμού στην διάρκεια των 6 ωρών των μετρήσεων, η μείωση κατά 1log έλαβε χώρα σε όλες τις περιπτώσεις πριν την πρώτη ώρα έκθεσης στον απολυμαντικό παράγοντα. Στην περίπτωση του μέσου Ringer μείωση του πληθυσμού κατά 1log παρατηρείται αργότερα σε ορισμένες

περιπτώσεις, τα δείγματα στους 20 °C μειώθηκαν στην πρώτη ώρα έκθεσης ενώ στους 4 °C στις 4 και 6 ώρες για τα στελέχη ScottA και EGD-e αντίστοιχα. Υποθανάτιος τραυματισμός εμφανίστηκε σε όλα τα στελέχη και αυξάνονταν σε ορισμένες περιπτώσεις με το πέρασ του χρόνου (Microcosm 20°C και στα δύο στελέχη, ScottA σε Ringer στους 20°C) (Γράφημα 3.19 και 3.20).

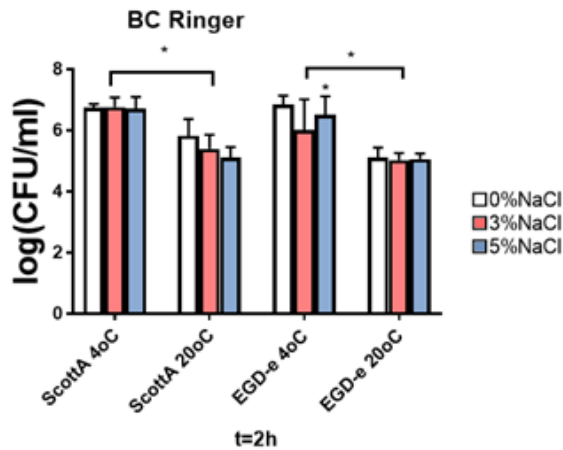
Αρχικά, στο χρονικό σημείο t=0h, υπήρχαν διαφορές στο πληθυσμιακό μέγεθος ανάμεσα σε δείγματα, συγκεκριμένα το στέλεχος ScottA σε μέσο Microcosm και στις δύο θερμοκρασίες είχε πληθυσμό περίπου 6,9log(CFU/ml), έναντι των υπόλοιπων περιπτώσεων που είχαν εκτιμώμενο πληθυσμό 7,05-7,35log(CFU/ml). Αυτό σημαίνει ότι σε ορισμένες περιπτώσεις, τα κύτταρα άρχισαν να θανατώνονται αμέσως. Ωστόσο ο τραυματισμός ήταν μηδενικός στα περισσότερα δείγματα ενώ σε εκείνα που ανιχνεύτηκε, δεν ήταν στατιστικά σημαντικός. Τα μόνα δείγματα με στατιστικά σημαντικό τραυματισμό στην στιγμή έκθεσης στον παράγοντα καταπόνησης ήταν τα EGD-e σε Ringer στους 20 °C με ποσοστό τραυματισμένων κυττάρων 23,7% (Γράφημα 3.20, Πίνακας 2-Υπόμνημα).

Στο χρονικό σημείο t=1h τα δείγματα Microcosm είχαν σημαντική μείωση του πληθυσμού έναντι των δειγμάτων σε Ringer (Γραφήματα 3.13-3.16) Ανάλυση 3way ANOVA έδειξε στην πρώτη ώρα έκθεσης σημαντική διαφορά ($\alpha=0.05$, $p<0.05$) ανάμεσα στα μέσα και στις δύο θερμοκρασίες. Τόσο στους 4°C όσο και στους 20°C υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα στελέχη στο Microcosm (Γραφήματα 3.13 και 3.14). Στο Ringer η διαφορά στην επιβίωση είναι στατιστικά σημαντική μεταξύ διαφορετικών θερμοκρασιών αλλά όχι μεταξύ στελεχών στην ίδια θερμοκρασία (Γράφημα 3.16).

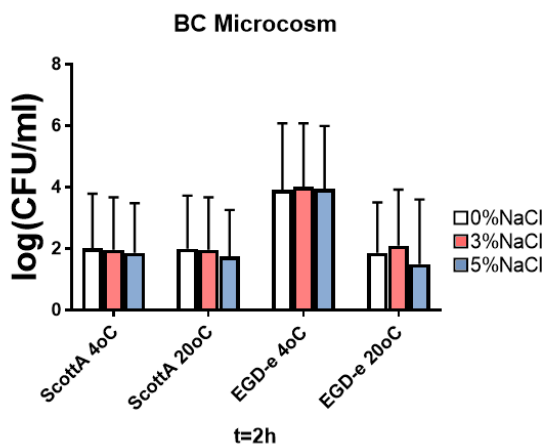


Γράφημα 3.13, 3.14, 3.15, 3.16. Επιβίωση και υποθανάτιος τραυματισμός κυττάρων *Listeria monocytogenes* στην πρώτη ώρα έκθεσης στο απολυμαντικό Benzalkonium Chloride $c=10^{-3}$ $\mu\text{g/ml}$. Με * και ** υποδηλώνονται σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε διαφορετικές ομάδες.

Στο χρονικό σημείο $t=2\text{h}$ ο πληθυσμός των κυττάρων διέφερε ανάμεσα στα μέσα διάλυσης Ringer-Microcosm Water. Ωστόσο, μόνο ένα δείγμα παρουσίασε στατιστικά σημαντικό τραυματισμό, το EGD-e σε Ringer στους 4°C . Με ανάλυση 3way ANOVA βρέθηκε ότι το μέσο ήταν ο καθοριστικός παράγοντας που διαμόρφωσε την επιβίωση των πληθυσμών. Σε κάθε μέσο δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ στελεχών αλλά η θερμοκρασία στο Ringer ήταν σημαντική για την επιβίωση των κυττάρων *Listeria monocytogenes*. Στους 4°C ο πληθυσμός ήταν μεγαλύτερος από ότι τους 20°C σε κάθε περίπτωση με εξαίρεση το ScottA σε Microcosm (Γράφημα 3.17a και 3.17b).

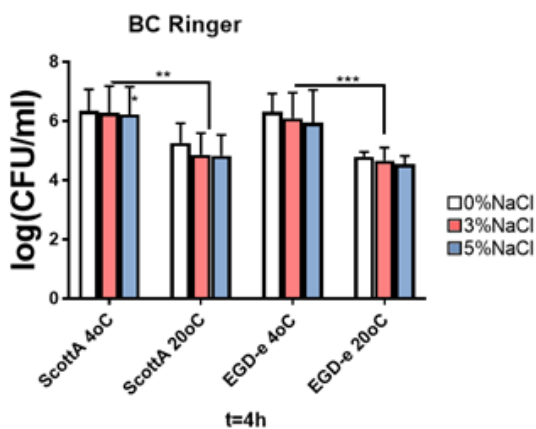


Γράφημα 3.17a. Επιβίωση και τραυματισμός των κυττάρων *Listeria monocytogenes* στο μέσο Ringer έπειτα από έκθεση σε BC για 2 ώρες.



Γράφημα 3.17b. Επιβίωση και τραυματισμός των κυττάρων *Listeria monocytogenes* στο μέσο Microcosm έπειτα από έκθεση σε BC για 2 ώρες.

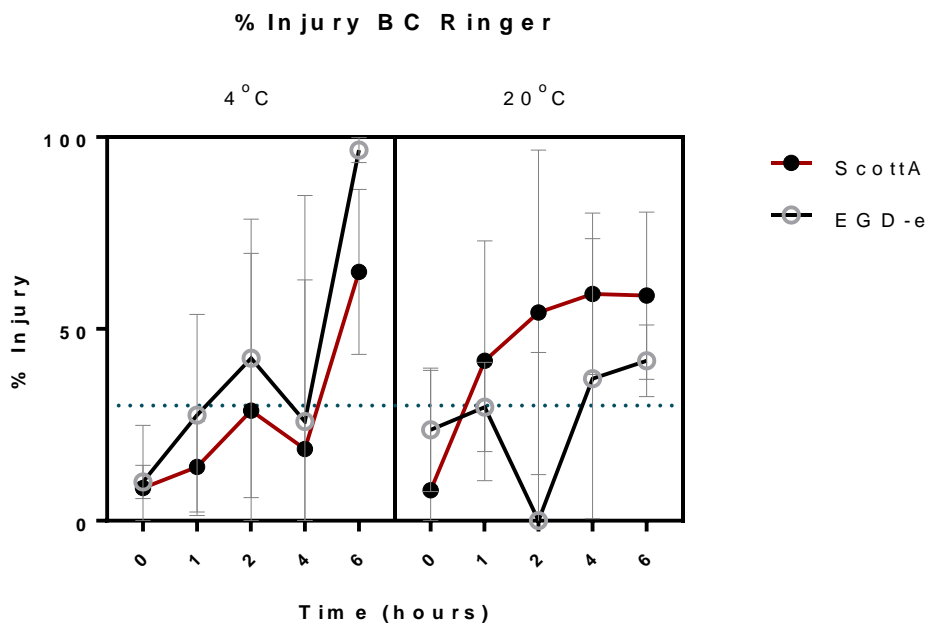
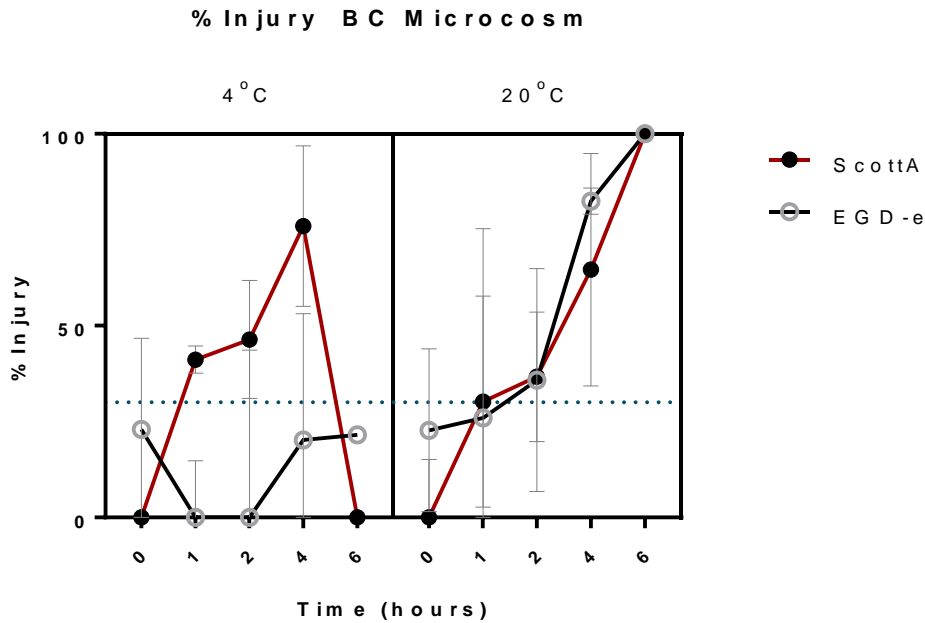
Στο χρονικό σημείο t=4h δύο τα στελέχη EGD-e διαλυμένα σε μέσο Microcosm και ScottA σε μέσο Ringer στους 20°C παρουσίασαν στατιστικά σημαντικό τραυματισμό 59,16% και 82,46% αντίστοιχα. Στο μέσο Ringer η θερμοκρασία ήταν καθοριστική για την επιβίωση (Γράφημα 3.18).



Γράφημα 3.18. Επιβίωση και τραυματισμός των κυττάρων *Listeria monocytogenes* στο μέσο Ringer έπειτα από έκθεση σε BC για 4 ώρες.

Όπως προαναφέρθηκε, το ποσοστό των τραυματισμένων κυττάρων σε ορισμένες περιπτώσεις αυξάνονταν όσο αυξάνονταν η έκθεση στον παράγοντα καταπόνησης. Στο Ringer στους 20°C (Γράφημα 3.20) το ποσοστό των τραυματισμένων κυττάρων δεν ξεπέρασε σε καμία χρονική στιγμή το 65% και ήταν μικρότερο συγκριτικά με το Microcosm (Γράφημα 3.19). Στο Microcosm στο τέλος του πειράματος τα τραυματισμένα κύτταρα αποτελούσαν το 100% του πληθυσμού των βακτηρίων και στα δύο στελέχη στους 20°C. (Γράφημα 3.19). Η θερμοκρασία σχετίζεται με τον τραυματισμό. Στο Microcosm στους 20°C ο τραυματισμός είναι περισσότερος από ότι στους 4 °C και αυξάνεται σε συνάρτηση με τον χρόνο (γράφημα 3.19). Στους 4°C το στέλεχος EGD-e σε Microcosm έχει τραυματισμό μικρότερο του 30% σε όλα τα χρονικά σημεία. Βλέπουμε επίσης ότι ο αρχικός τραυματισμός σε όλα τα μέσα, θερμοκρασίες και στελέχη είναι μικρότερος από 30%(γραφήματα 3.19 και 3.20). Στον Πίνακα2 του υπομνήματος παρουσιάζονται για κάθε δείγμα και κάθε χρονική στιγμή η ύπαρξη ή απουσία στατιστικά σημαντικού τραυματισμού όπως προέκυψε από σύγκριση τρυβλίων TSAYE με συγκέντρωση NaCl 0% και 5%.

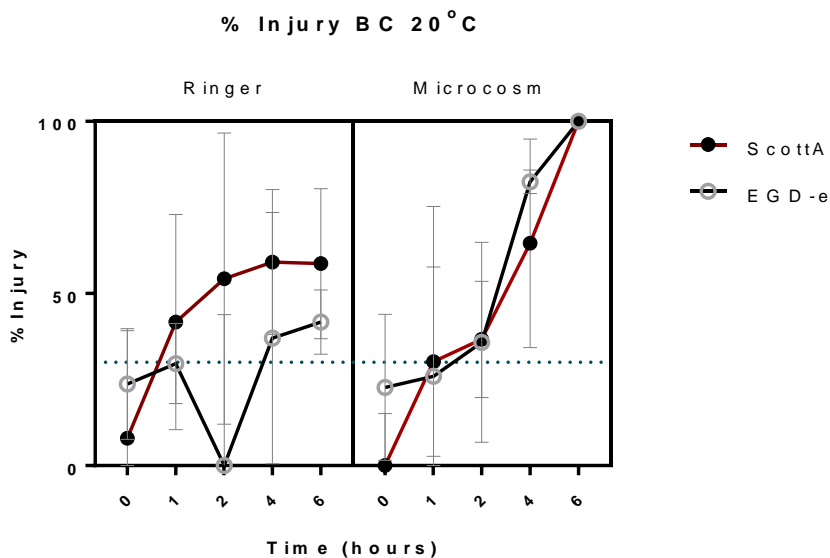
Στα στελέχη EGD-e και ScottA ο τραυματισμός μεταβάλλεται με το πέρας του χρόνου με σημαντική διαφορά τόσο ανάμεσα στα μέσα όσο και στις θερμοκρασίες (Γράφημα 3.19,3.20, 3.22a, 3.22b). Σε Microcosm στους 20 °C ο υποθανάτιος τραυματισμός αυξάνεται όσο τα κύτταρα εκτίθενται στο όξινο περιβάλλον και στα δύο στελέχη. Στους 4 °C σε Ringer, το EGD-e εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό τραυματισμού σε κάθε στιγμή συγκριτικά με το ScottA, ωστόσο και στα δύο στελέχη ο τραυματισμός αυξάνεται έως τις δύο ώρες έως το 30% στο ScottA και 42% στο EGD-e, στην επόμενη χρονική στιγμή μειώνεται σε επίπεδα κάτω του 30% και στο τελευταίο χρονικό σημείο ο υποθανάτιος τραυματισμός αυξάνεται έως το 99% για το EGD-e και 75% για το ScottA. Αντίθετα με τα παραπάνω, στους 4 °C σε μέσο Microcosm και στους 20 °C σε μέσο Ringer, παρουσιάζεται διαφοροποίηση μεταξύ των στελεχών, με το ScottA να εμφανίζει περισσότερο τραυματισμό σε κάθε χρονική στιγμή (Γράφημα 3.19, 3.20).



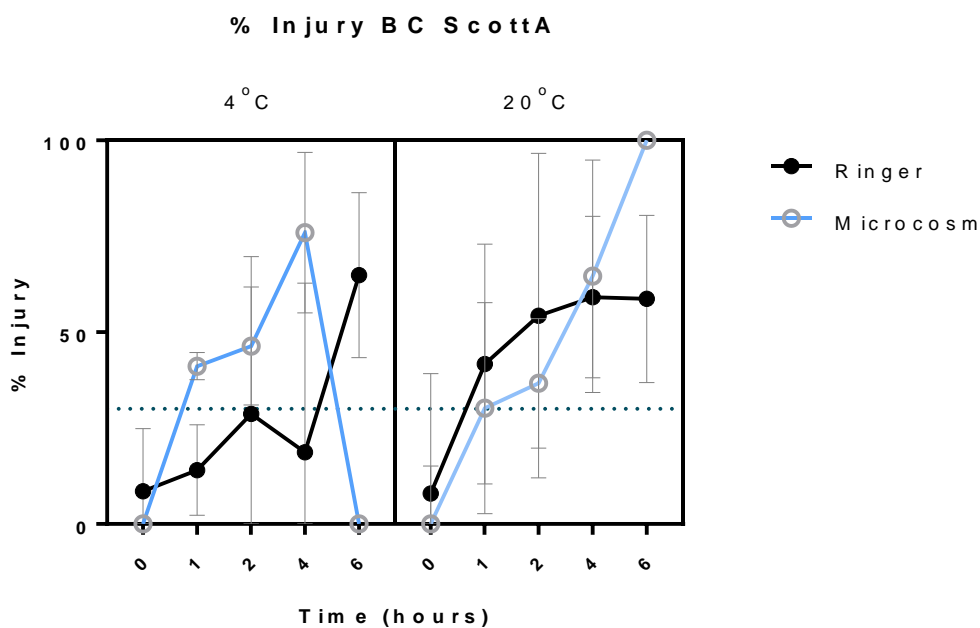
Γράφημα 3.19 και 3.20. Ο τραυματισμός δύο στελεχών ScottA και EGD-e *Listeria monocytogenes* εκπεφρασμένος ως ποσοστό τραυματισμένων κυττάρων στον συνολικό πληθυσμό σε μέσο Microcosm (πάνω-γράφημα 3.19 και σε μέσο Ringer (κάτω-γράφημα 3.20) κατά την διάρκεια έκθεσης στον απολυμαντικό παράγοντα BC συγκέντρωσης 10ppm.

Στο Γράφημα 3.21 παρουσιάζεται ο τραυματισμός των δύο στελεχών στα δύο μέσα στους 20 °C. Στο Microcosm ο τραυματισμός αυξάνεται όσο τα κύτταρα εκτίθενται στον απολυμαντικό παράγοντα και στην τελευταία μέτρηση είναι 100%. Στο μέσο διάλυσης Ringer στο στέλεχος ScottA ο τραυματισμός αυξάνεται από 6,16% του συνολικού πληθυσμού στην πρώτη ώρα έκθεσης σε 54,31% στην δεύτερη ώρα και έπειτα μένει σχετικά σταθερός, με 58,67% των κυττάρων να είναι τραυματισμένα ως την 6^η ώρα της έκθεσης στον παράγοντα. Στο EGD-e

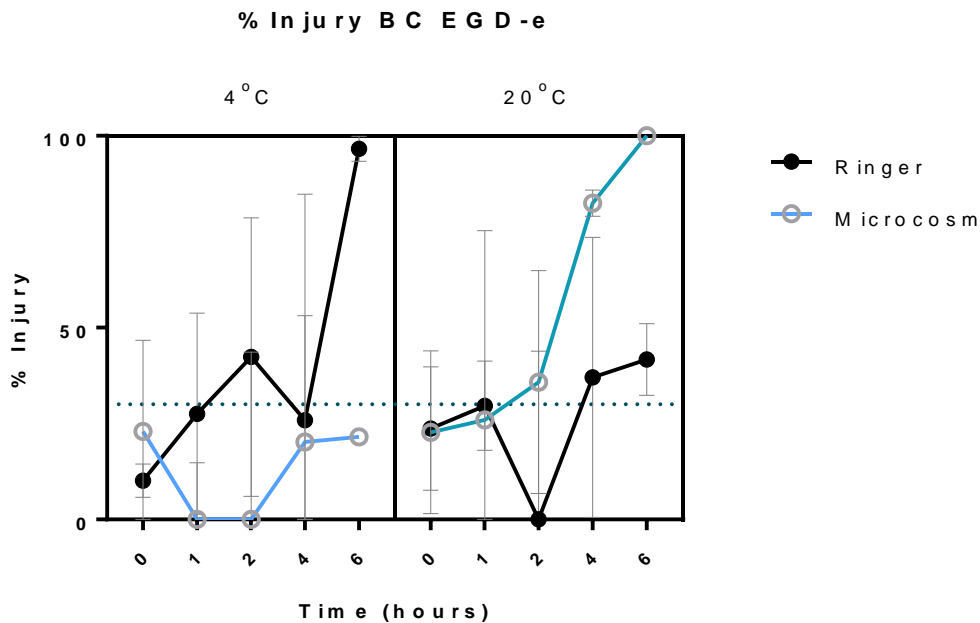
στο ίδιο μέσο διάλυσης, ο τραυματισμός αυξάνεται από 0% στην δεύτερη ώρα έκθεσης σε 37,01% στην 4^η ώρα και σε 41,70% ως την 6^η ώρα της έκθεσης στον παράγοντα.



Εικόνα 3.21. Σύγκριση του τραυματισμού στα δύο στελέχη *Listeria monocytogenes* ScottA και EGD-e στα δύο μέσα Ringer και Microcosm Water στους 20 °C κατά την διάρκεια της έκθεσης στον απολυμαντικό παράγοντα BC συγκέντρωσης 10ppm.



Γράφημα 3.22α. Σύγκριση του % υποθανάτιου τραυματισμού στο στέλεχος ScottA στους 4 °C και 20 °C στα δύο μέσα Ringer και Microcosm Water.



Γράφημα 3.22b. Σύγκριση του % υποθανάτιου τραυματισμού στο στέλεχος EGD-e στους 4 °C και 20 °C στα δύο μέσα Ringer και Microcosm Water.

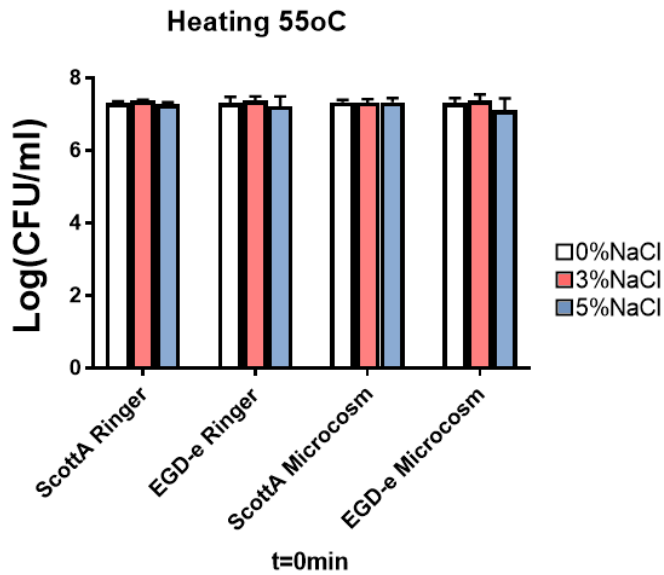
Συμπερασματικά, η επιβίωση ο υποθανάτιος τραυματισμός στα κύτταρα δύο στελεχών *Listeria monocytogenes* καθορίστηκαν από το μέσο εμβολιασμού και την θερμοκρασία. Ο υποθανάτιος τραυματισμός ήταν μεγαλύτερος στο μέσο Microcosm στους 20 °C στο πέρας της έκθεσης των κυττάρων στον παράγοντα καταπόνησης Σε διαφορετικές συνθήκες τα στελέχη ομοιάζουν ή διαφέρουν ως προς τον τραυματισμό που εμφανίζουν. Παρατηρείται ότι σε ορισμένα δείγματα ο τραυματισμός αυξάνεται όσο αυξάνεται η έκθεση στην καταπόνηση.

3.4. Αξιολόγηση του υποθανάτιου τραυματισμού στα στελέχη ScottA και EGD-e του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* έπειτα από θέρμανση στους 55°C.

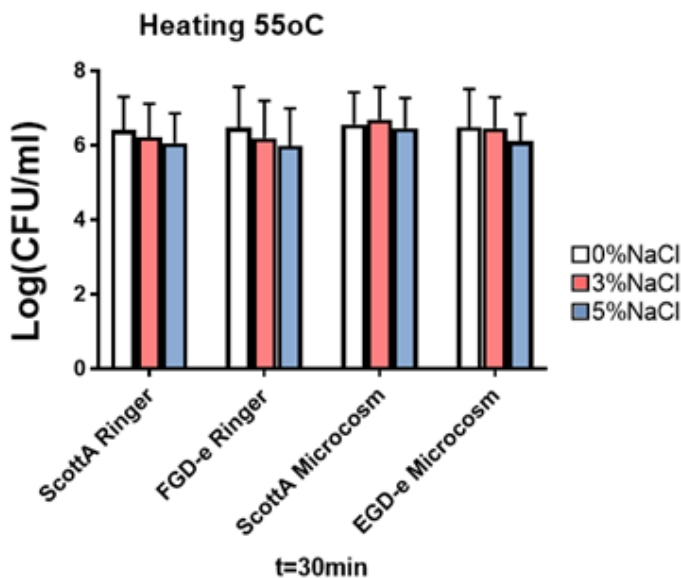
Εμβόλιο από κάθε στέλεχος διαλύθηκε σε κάθε ένα από τα δύο μέσα Ringer ή Microcosm και ακολούθησε θέρμανση στους 55°C. Οι δειγματοληψίες έλαβαν χώρα με την συχνότητα $t_0=0\text{min}$, $t_1=30\text{min}$, $t_2=60\text{min}$, $t_3=90\text{min}$ και $t_4=120\text{min}$.

Στα πρώτα 30 λεπτά έκθεσης των βακτηρίων στην υψηλή θερμοκρασία, στο στέλεχος EGD-e στο μέσο Ringer ο πληθυσμός μειώθηκε κατά $1,1\log(\text{CFU/ml})$, στο Microcosm κατά $1,65\log(\text{CFU/ml})$, στο στέλεχος ScottA σε Ringer κατά $0,9\log(\text{CFU/ml})$ και σε Microcosm κατά $1,16\log(\text{CFU/ml})$.

Στην χρονική στιγμή t_0 , όπου τα κύτταρα εκτέθηκαν στους 55°C, δεν παρατηρείται μείωση του πληθυσμού (Γράφημα 3.23). Ο πληθυσμός μειώνεται και ο τραυματισμός αυξάνεται σε όλα τα δείγματα όταν τα κύτταρα έχουν θερμανθεί για 30 λεπτά. Το στέλεχος ScottA εμφανίζει μεγαλύτερο %τραυματισμό στο μέσο Ringer, ενώ το EGD-e στο μέσο Microcosm κατά τον χρόνο έκθεσης, όπως φαίνεται στο γράφημα 3.28.

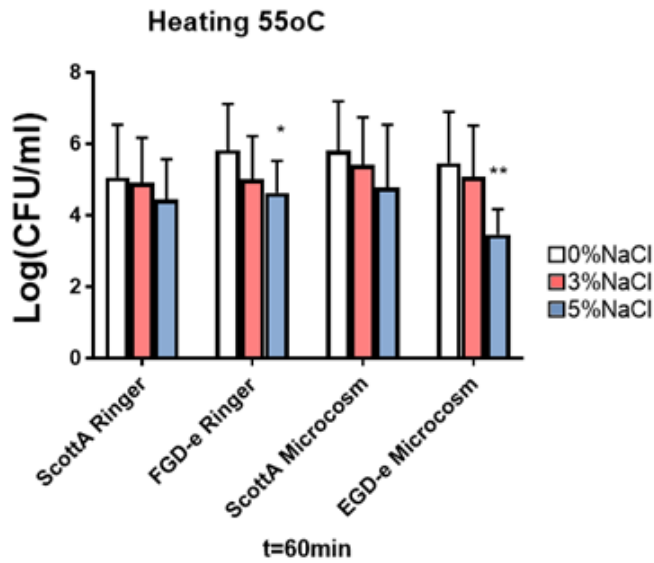


Γράφημα 3.23. Επιβίωση και τραυματισμός των δύο στελεχών *Listeria monocytogenes* ScottA και EGD-e στα μέσα διάλυσης Ringer και Microcosm την στιγμή της έκθεσης σε υψηλή θερμοκρασία 55°C.



Γράφημα 3.24. Επιβίωση και τραυματισμός των δύο στελεχών *Listeria monocytogenes* ScottA EGD-e στο υπόστρωμα TSAYE με συγκέντρωση NaCl 0%,3% και 5% όταν επωάζονται στα μέσα Ringer και Microcosm σε θερμοκρασία 55°C για 30min.

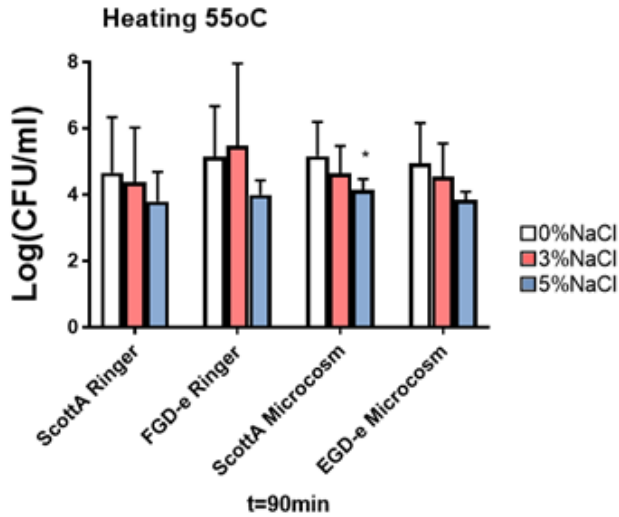
Έπειτα από έκθεση στους 55°C για 60 λεπτά, το στέλεχος EGD-e εμφανίζει στατιστικά σημαντικό τραυματισμό, με το 65% των κυττάρων να είναι τραυματισμένα στο μέσο Ringer και το 48,4% στο μέσο Microcosm (γράφημα 3.25). Ο τραυματισμός αυξάνεται σε σχέση με τα προηγούμενα χρονικά σημεία (γράφημα 3.38). Το στέλεχος ScottA εξακολουθεί να εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό τραυματισμένων κυττάρων όταν επωάζεται στο μέσο Ringer, ενώ το EGD-e στο μέσο Microcosm, όπως φαίνεται στο γράφημα 3.28.



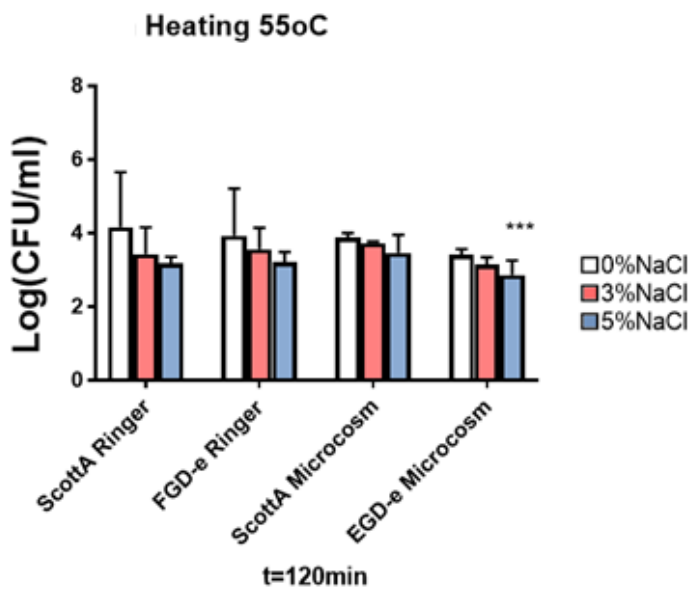
Γράφημα 3.25. Επιβίωση και τραυματισμός των δύο στελεχών *Listeria monocytogenes* σε μέσα Ringer και Microcosm θερμοκρασία 55°C για 60min. Με * και ** σημειώνεται η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς ανάμεσα στον πληθυσμό βακτηρίων που υπολογίζεται από τα τρυβλία TSAYE απουσία και παρουσία 5% NaCl.

Έπειτα από 90 λεπτά υπό καταπόνηση, στο στέλεχος ScottA σε Ringer, ο τραυματισμός παραμένει σταθερός, ενώ στο Microcosm είναι στατιστικά σημαντικός (γράφημα 3.26), και έχει αυξηθεί συγκριτικά με το προηγούμενο χρονικό σημείο (Γράφημα 3.28). Το μέγεθος του πληθυσμού, όπως υπολογίζεται από τα τρυβλία TSAYE απουσία επιλεκτικού παράγοντα, φαίνεται να διαφέρει αλλά η διαφορά μεταξύ των μέσων διάλυσης στο συγκεκριμένο χρονικό σημείο δεν είναι στατιστικά σημαντική (Γράφημα 3.26). Στο στέλεχος EGD-e, ο τραυματισμός των κυττάρων που επωάζονται στο μέσο Ringer έχει αυξηθεί και έχει ξεπεράσει τον τραυματισμό των κυττάρων που επωάζονται σε Microcosm (52.73% των κυττάρων σε Ringer είναι τραυματισμένα, έναντι 49.15% των κυττάρων σε Microcosm) (Γράφημα 3.28). Ταυτόχρονα, το μικροβιακό φορτίο των ζωντανών κυττάρων έχει μειωθεί συγκριτικά με το προηγούμενο χρονικό σημείο, ωστόσο η επώαση σε διαφορετικά μέσα διάλυσης δεν επιφέρει σημαντικές διαφορές αναφορικά με το μέγεθος του πληθυσμού, συμπεριλαμβανομένων υγιών και τραυματισμένων κυττάρων.

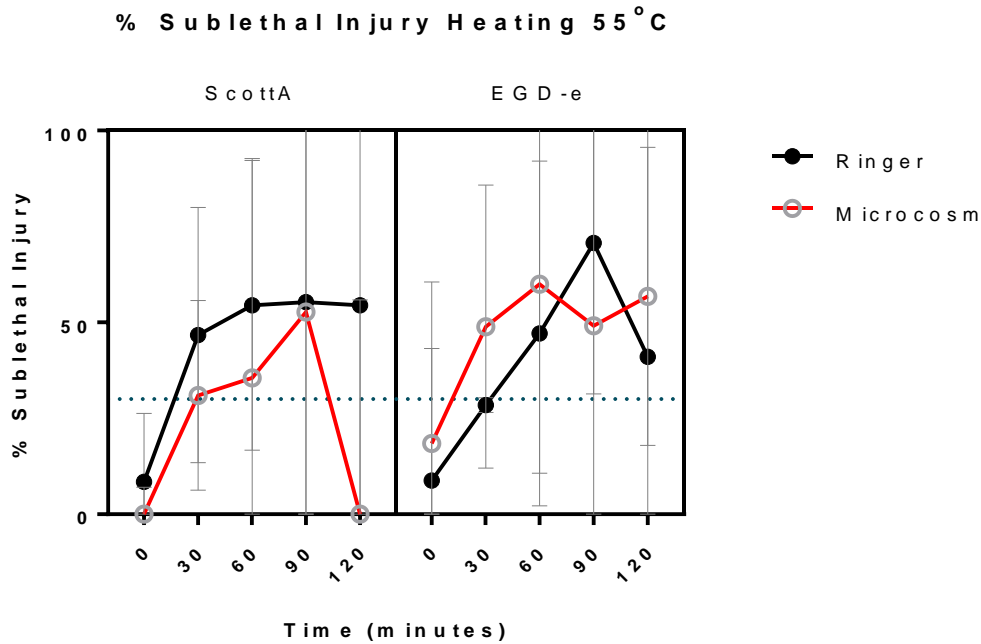
Στα 120 λεπτά υπό καταπόνηση, ο πληθυσμός σε όλα τα δείγματα ήταν μειωμένος περίπου κατά 4log. Δεν ανιχνεύονται σημαντικές διαφορές αναφορικά με την επιβίωση μεταξύ των στελεχών και των μέσων επώασης (Γράφημα 3.27). Ο τραυματισμός παραμένει σταθερός στο στέλεχος ScottA σε μέσο Ringer, με 55% των κυττάρων να είναι τραυματισμένα, και μειώνεται στο μέσο Microcosm από 70,71% στα 90 λεπτά έκθεσης σε 41,02% στα 120 λεπτά. Στο στέλεχος EGD-e ο τραυματισμός των κυττάρων που επωάζονται σε Ringer μηδενίζεται ενώ στο μέσο Microcosm αυξάνεται από 49,15% σε 56,80%(Γράφημα 3.28).



Γράφημα 3.26. Επιβίωση και τραυματισμός των δύο στελεχών *Listeria monocytogenes* όταν επωάζονται σε θερμοκρασία 55°C για 90min. Με * σημειώνεται η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς ανάμεσα στον πληθυσμό βακτηρίων που υπολογίζεται από τα τρυβλία TSAYE απουσία και παρουσία 5% NaCl.



Γράφημα 3.27. Επιβίωση και τραυματισμός των δύο στελεχών *Listeria monocytogenes* όταν επωάζονται σε θερμοκρασία 55°C για 90min. Με *** σημειώνεται η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς ανάμεσα στον πληθυσμό βακτηρίων που υπολογίζεται από τα τρυβλία TSAYE απουσία και παρουσία 5% NaCl.



Γράφημα 3.28. Ο τραυματισμός σε δύο στελέχη *Listeria monocytogenes* σε θερμοκρασία 55°C.

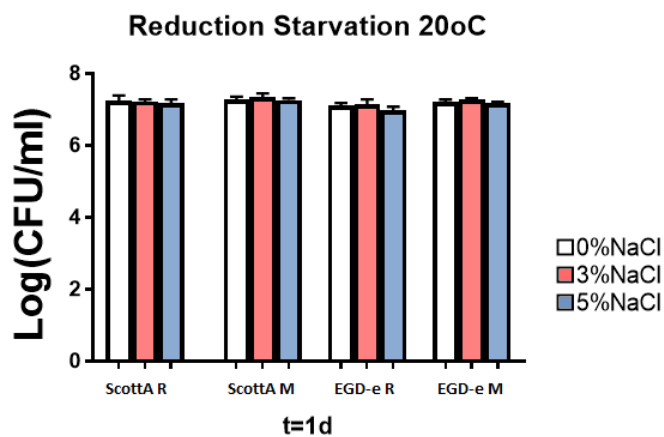
Συνολικά, η καταπόνηση υπό θερμοκρασία 55°C, μείωσε τον πληθυσμό κυττάρων *Listeria monocytogenes* κατά περίπου 4log σε διάστημα 120 λεπτών. Σε κανένα χρονικό σημείο δεν ανιχνεύτηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές αναφορικά με το πληθυσμιακό μέγεθος μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών. Ο τραυματισμός των βακτηρίων ήταν μη σημαντικός στην έναρξη της καταπόνησης και αυξήθηκε στα επόμενα χρονικά σημεία. Στο στέλεχος ScottA σε Ringer, ο τραυματισμός αυξήθηκε έπειτα από μισή ώρα καταπόνησης και παρέμεινε σχετικά σταθερός ως το τέλος του πειράματος. Στο Microcosm ο τραυματισμός αυξάνεται έως τα 90 λεπτά καταπόνησης και έπειτα μηδενίζεται. Ο τραυματισμός σε Ringer είναι περισσότερος από τον αντίστοιχο τραυματισμό σε μέσο Microcosm για το στέλεχος ScottA. Στο στέλεχος EGD-e, το ποσοστό των τραυματισμένων κυττάρων στα δείγματα αυξάνεται και στα δύο μέσα επώασης, με το μέσο Microcosm να παρουσιάζει σχεδόν σε όλες τις χρονικές στιγμές μεγαλύτερο τραυματισμό. Στην τελευταία χρονική στιγμή του πειράματος ωστόσο, το ποσοστό των τραυματισμένων κυττάρων στο στέλεχος EGD-e σε Ringer μειώνεται σε 40%.

3.5 Αξιολόγηση του υποθανάτιου τραυματισμού στα στελέχη ScottA και EGD-e του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* έπειτα από καταπόνηση λόγω έλλειψης θρεπτικών συστατικών (Λιμός- Starvation).

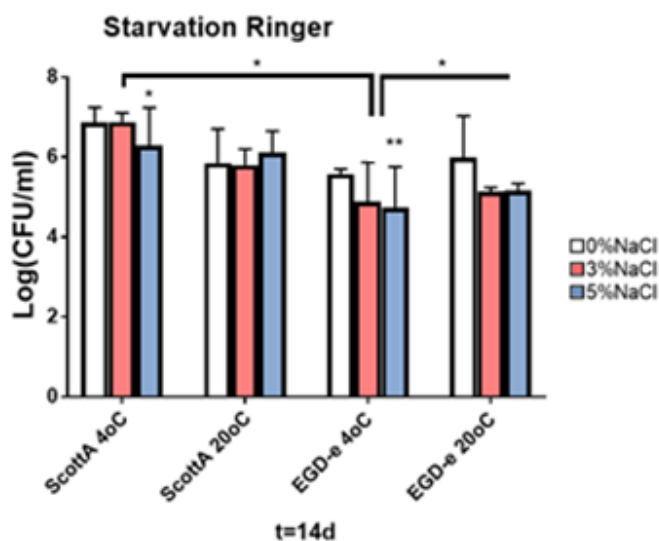
Αρχικός πληθυσμός 10^7 CFU/ml από δύο στελέχη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* εμβολιάστηκαν σε Ringer και Microcosm και επωάστηκαν στους 4 °C και 20 °C για δύο μήνες (οκτώ εβδομάδες). Μία φορά την εβδομάδα πραγματοποιούνταν δειγματοληψία για την εκτίμηση της επιβίωσης και του τραυματισμού. Λαμβάνονταν από κάθε δείγμα όγκος 100ml ο οποίος επιστρώνονταν σε τρυβλία με επιλεκτικά και μη επιλεκτικά θρεπτικά μέσα. Τα πειράματα Starvation και Starvation +7%NaCl έγιναν δύο βιολογικές -και όπως σε όλα τα πειράματα- δύο τεχνικές επαναλήψεις.

Τα περισσότερα δείγματα περιείχαν ζωντανά κύτταρα είτε αυτά ήταν τραυματισμένα, είτε υγιή έως το τέλος του πειράματος, 8 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό. Εξαιρέση αναφορικά με την επιβίωση, αποτελεί το στέλεχος ScottA σε Microcosm στους 20 °C το οποίο θανατώθηκε μέχρι την τέταρτη εβδομάδα του πειράματος, με όλα τα κύτταρα του δείγματος να είναι τραυματισμένα εκείνη την χρονική στιγμή (Γράφημα 3.31 και 3.34). Το στέλεχος EGD-e σε Microcosm στους 4 °C θανατώθηκε την 7^η εβδομάδα του πειράματος. Η μείωση κατά 1log στον πληθυσμό κάθε δείγματος παρατηρούνταν σε πρότερη χρονική στιγμή στους 20°C από ότι στους 4°C.

Τραυματισμός εμφανίστηκε σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν, ορισμένες φορές και από την πρώτη εβδομάδα, αλλά σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν ο αρχικός τραυματισμός δεν ξεπέρασε το 30% (γράφημα 3.33 και Πίνακας4, Υπόμνημα). Στις 14 μέρες υπάρχει στατιστικά σημαντικός τραυματισμός και στα δύο στελέχη, στο μέσο Ringer στους 4°C(γράφημα 3.30), στην περίπτωση του EGD-e αυτό το γεγονός συνδυάζεται με απότομη μείωση του πληθυσμού, ενώ στο στέλεχος ScottA αυτό δεν παρατηρείται.

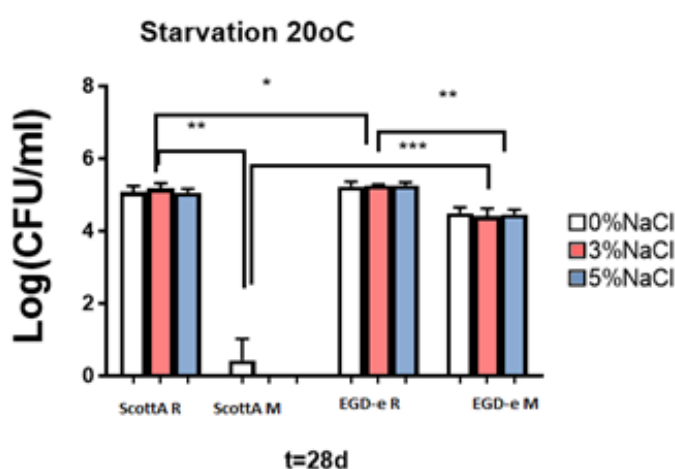


Γράφημα 3.29. Επιβίωση και τραυματισμός των κυττάρων *Listeria monocytogenes* στα στελέχη ScottA και EGD-e σε μέσα Ringer και Microcosm στους 20 °C έπειτα από έκθεση σε λιμό για 24 ώρες (1 ημέρα). Η επιβίωση εκτιμάται από τα τρυβλία με TSAYE απουσία επιλεκτικού παράγοντα.

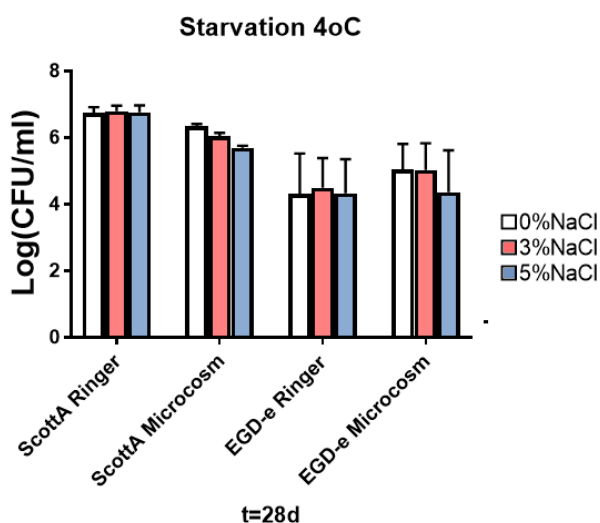


Γράφημα 3.30. Επιβίωση και τραυματισμός των κυττάρων δύο στελεχών, ScottA και EGD-e *Listeria monocytogenes* σε μέσο Ringer σε συνθήκη λιμού έπειτα από 14 ημέρες (2 εβδομάδες) έκθεσης. Με * και ** συμβολίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ διαφορετικών ομάδων.

Έπειτα από 28 μέρες υπό έλλειψη θρεπτικών συστατικών, το στέλεχος ScottA σε Microcosm στους 20 °C έχει σχεδόν θανατωθεί, ενώ όλα τα κύτταρα του θεωρούνται τραυματισμένα. Στους 4°C ο πληθυσμός των ζωντανών κυττάρων είναι σε κάθε περίπτωση μεγαλύτερος από ότι στους 20°C (Γράφημα 3.31a και 3.31b). Παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δείγματα που αντιστοιχούν σε διαφορετικό στέλεχος και μέσο διάλυσης και επωάζονται στους 20 °C (γράφημα 3.31a). Αντίστοιχα στους 4°C δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις πειραματικές συνθήκες (γράφημα 3.31b).

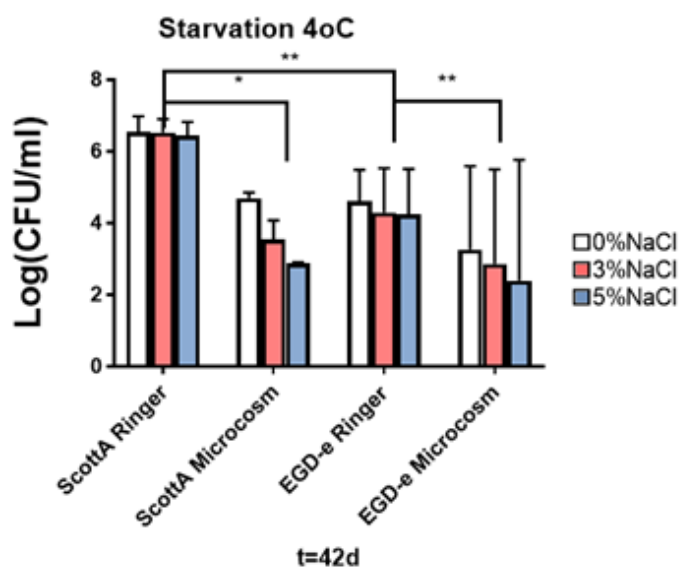


Γράφημα 3.31a. Επιβίωση και τραυματισμός των κυττάρων δύο στελεχών *Listeria monocytogenes* στους 20 °C έπειτα από έκθεση σε λιμό για 28 ημέρες (4 εβδομάδες). Με *, ** και *** συμβολίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ διαφορετικών ομάδων.



Γράφημα 3.31b. Επιβίωση και τραυματισμός των κυττάρων δύο στελεχών *Listeria monocytogenes* στους 4°C έπειτα από έκθεση σε λιμό για 28 ημέρες (4 εβδομάδες). Με *, ** και *** συμβολίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ διαφορετικών ομάδων.

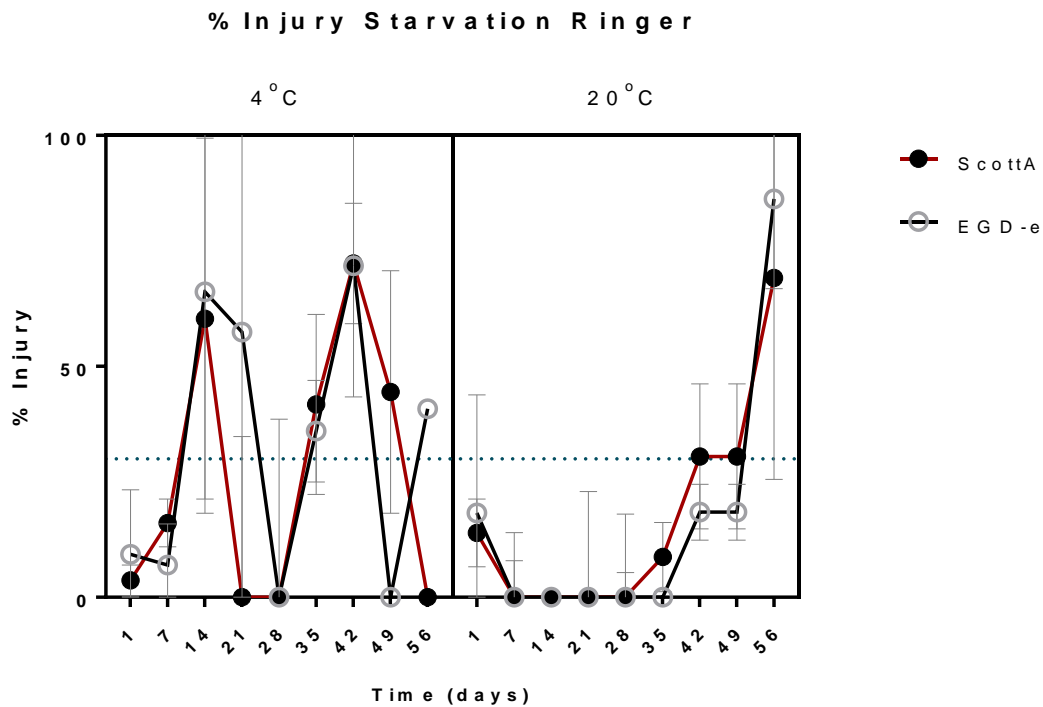
Στις 42 ημέρες στο μέσο Ringer στους 4 °C ο τραυματισμός και στα δύο στελέχη είναι ο μέγιστος και φτάνει το 70%. (Γράφημα 3.32 και 3.33). Στατιστικά σημαντικές διαφορές εντοπίζονται τόσο ανάμεσα στα διαφορετικά στελέχη, όσο και στα διαφορετικά μέσα (γράφημα 3.32). Τόσο στο στέλεχος ScottA όσο και στο EGD-e σε Ringer στους 20 °C σημειώθηκε μείωση πληθυσμού κατά 2log και στο τέλος του πειράματος το 70% και 80% των κυττάρων αντίστοιχα είναι τραυματισμένα. Σε όλες τις περιπτώσεις δεν ανιχνεύεται τραυματισμός την πρώτη μέρα επώασης κάτω από συνθήκες λιμού. Ο υποθανάτιος τραυματισμός μηδενίζεται για εβδομάδες-ενώ ο πληθυσμός μένει σταθερός- και στην συνέχεια αυξάνεται έως την τελευταία δειγματοληψία. Στο στέλεχος ScottA σε Ringer στους 20 °C ο τραυματισμός έπειτα από 8 εβδομάδες σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών φτάνει το 69,14% ενώ μόλις την προηγούμενη εβδομάδα ήταν στο 30,50%, και στο EGD-e σε Ringer στους 20°C ο τραυματισμός την όγδοη εβδομάδα είναι 86,27% ενώ τις προηγούμενες εβδομάδες είχε μείνει στο 18,42% (Γράφημα 3.33).



Γράφημα 3.32. Επιβίωση και τραυματισμός των κυττάρων δύο στελεχών *Listeria monocytogenes* στους 4°C έπειτα από έκθεση σε λιμό για 42 ημέρες (6 εβδομάδες) . Με * και ** συμβολίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ διαφορετικών ομάδων.

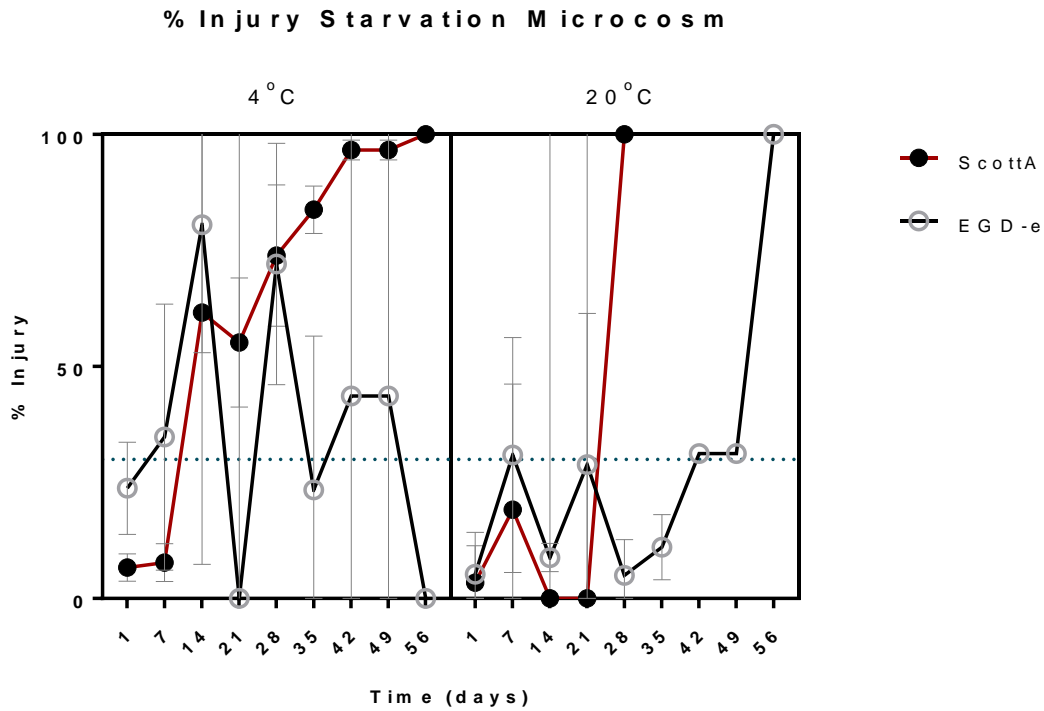
Στο μέσο Ringer ο τραυματισμός δεν διαφέρει μεταξύ στελεχών αλλά μεταξύ θερμοκρασιών (Γράφημα 3.33). Στους 4°C ο τραυματισμός είναι μη σημαντικός την πρώτη εβδομάδα μετρήσεων και στην συνέχεια αυξάνεται και μειώνεται σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και στα δύο στελέχη, εμφανίζοντας τραυματισμό 70% έπειτα από 7 εβδομάδες (49 ημέρες έκθεσης) στην καταπόνηση. Αντίθετα, στους 20 °C τα κύτταρα παρουσιάζουν αρχικό τραυματισμό μικρότερο του 30%, ο οποίος μηδενίζεται για εβδομάδες, πιθανώς επειδή τα

τραυματισμένα κύτταρα θανατώθηκαν. Ο πληθυσμοί του EGD-e ,όπως εκτιμώνται από τα τρυβλία TSAYE με 0%NaCl, σε εκείνο το χρονικό διάστημα παρουσίασαν μία απότομη πτώση και ως το τέλος του πειράματος παρέμειναν σταθεροί. Στο ScottA παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού κάθε εβδομάδα, ο πληθυσμός ωστόσο σταθεροποιήθηκε τις τελευταίες τέσσερις εβδομάδες.

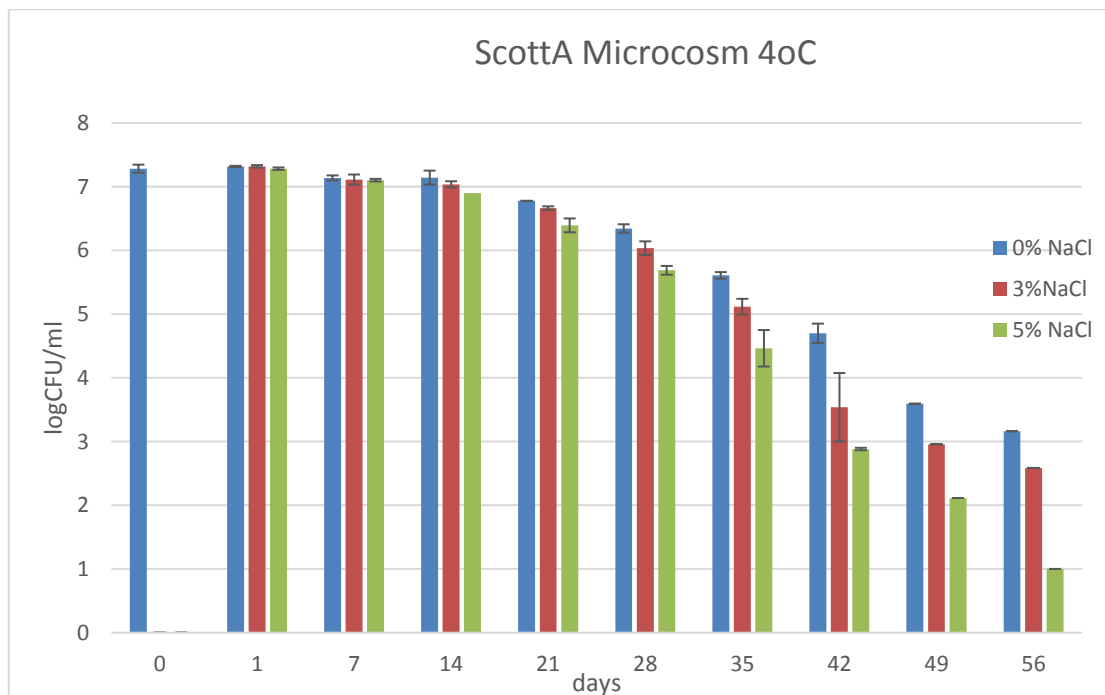


Γράφημα 3.33. Σύγκριση του % τραυματισμού στα δύο στελέχη *Listeria monocytogenes* στο μέσο Ringer όταν τα κύτταρα βιώνουν λιμό στους 4 °C και 20 °C.

Στο μέσο Microcosm ο τραυματισμός διαφέρει μεταξύ στελεχών και μεταξύ θερμοκρασιών. Στην περίπτωση ScottA, ο τραυματισμός αυξάνεται όσο αυξάνεται η παραμονή των κυττάρων στο μέσο καταπόνησης, ενώ στην τελευταία μέτρηση όλα τα κύτταρα είναι τραυματισμένα. Ταυτόχρονα ο πληθυσμός των κυττάρων μειώνεται (Γράφημα 3.34 και 3.35). Στους 20 °C στο ίδιο στέλεχος ο πληθυσμός μειώνεται απότομα από την δεύτερη εβδομάδα, και ταυτόχρονα αυξάνεται ο τραυματισμός. Το στέλεχος EGD-e διαφέρει σημαντικά από το ScottA και στις δύο θερμοκρασίες αναφορικά με τον υποθανάτιο τραυματισμό. Παρατηρούνται αυξομειώσεις τις πρώτες πέντε εβδομάδες και έπειτα μία περίοδος που ο τραυματισμός είναι σταθερός προς το τέλος του πειράματος. Την τελευταία εβδομάδα ο τραυματισμός μηδενίζεται στους 4 °C και φτάνει το 100% στους 20 °C. Ο πληθυσμός ωστόσο παραμένει σταθερός (Γράφημα 3.36 και 3.37). Ο τραυματισμός παρουσιάζει μεν ομοιότητες σε κάθε στέλεχος αλλά στους 4 °C είναι εντονότερος σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία συγκριτικά με τους 20 °C, όπως φαίνεται στο γράφημα 3.34.



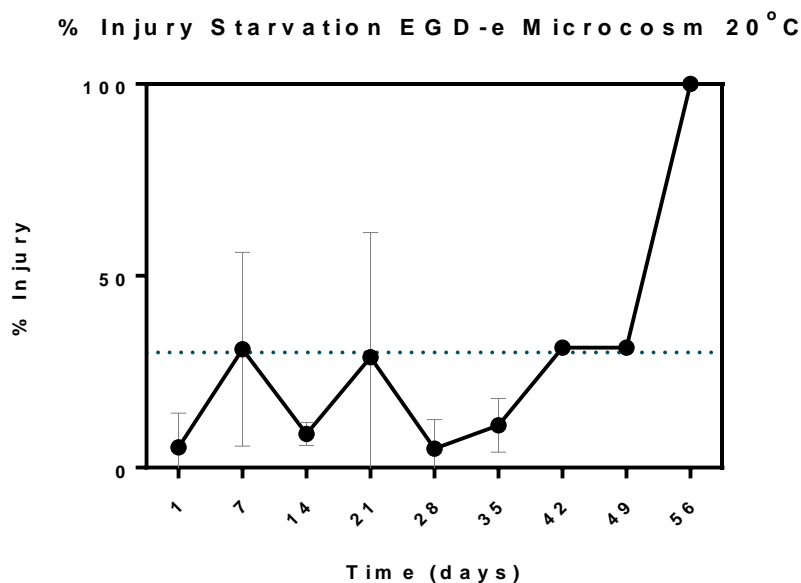
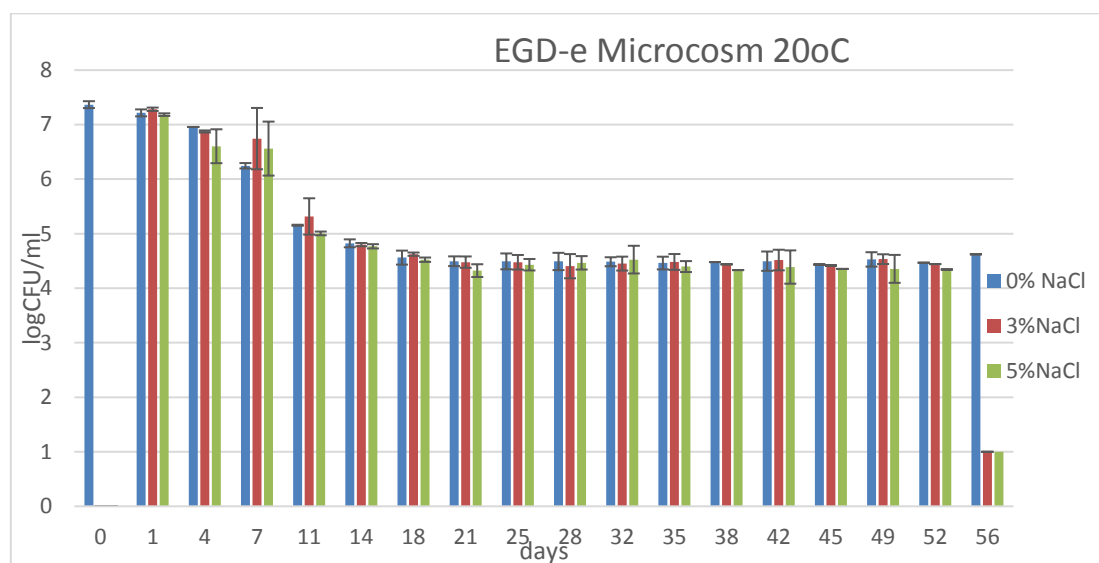
Γράφημα 3.34 Σύγκριση του τραυματισμού στα δύο στελέχη *Listeria monocytogenes* στο μέσο Microcosm όταν τα κύτταρα βιώνουν λιμό στους 4°C και 20°C.



Γράφημα 3.35. Μείωση του πληθυσμού στο στέλεχος ScottA σε μέσο Microcosm στους 20 °C υπό συνθήκες έλλειψης θρεπτικών μέσων.

Στα παρακάτω γραφήματα, 3.36 και 3.37 παρουσιάζεται η επιβίωση και ο υποθανάτιος τραυματισμός για το στέλεχος EGD-e σε Microcosm στους 20 °C. Ο πληθυσμός όπως εκτιμάται από τα τρυβλία χωρίς επιλεκτικό μέσο, μειώνεται απότομα από την 1^η ως την 11^η μέρα και έπειτα μένει

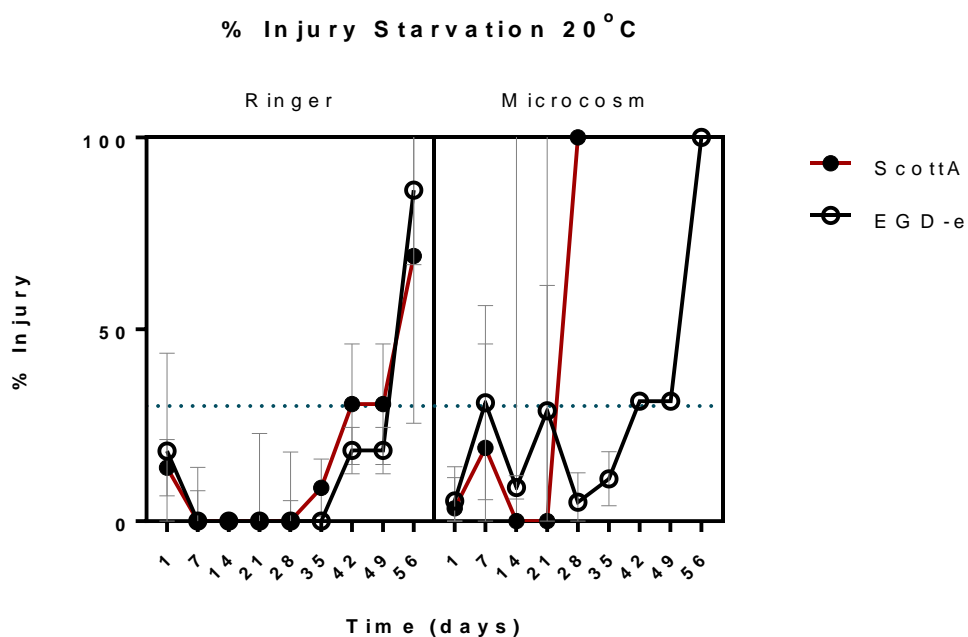
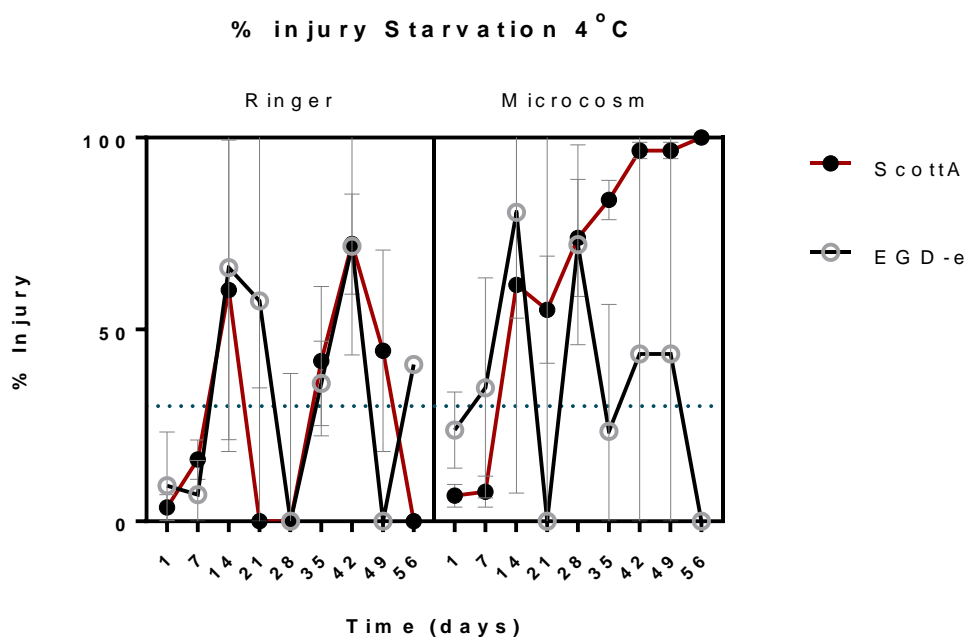
σχετικά σταθερός. Ο υποθανάτιος τραυματισμός αυξομειώνεται και τελικά αγγίζει το 100%. Αυτό είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα που δείχνει ότι η θανάτωση και τραυματισμός δεν συμβαδίζουν απαραίτητα.



Γραφήματα 3.36 και 3.37. Στέλεχος EGD-e σε Microcosm στους 20 °C. Η μείωση του πληθυσμού (πάνω-γράφημα 3.36) και ο υποθανάτιος τραυματισμός (κάτω-γράφημα 3.37) παρουσιάζονται ως το πέρας 8 εβδομάδων στο στέλεχος EGD-e σε μέσο Microcosm στους 20 °C υπό συνθήκες έλλειψης θρεπτικών μέσων

Ο υποθανάτιος τραυματισμός σε σχέση με τον χρόνο για κάθε θερμοκρασία παρουσιάζεται στα γραφήματα 3.38 και 3.39. Στους 4°C ο τραυματισμός τείνει να είναι χαμηλός, έως 40,84% στο τέλος του πειράματος με μία εξαίρεση, το ScottA σε μέσο Microcosm στους 4°C όπου εμφάνισε τελικό τραυματισμό 100%, σε αντίθεση με τα δείγματα που επώαστηκαν στους

20°C, όπου ο τραυματισμός αυξάνεται συνεχώς από την 5^η έως την 8^η εβδομάδα. Συγκεκριμένα, στην τελευταία δειγματοληψία ο τραυματισμός ήταν 69,14% για το ScottA σε Ringer, 86,27% για το EGD-e σε Ringer, και 100% για τα δύο στελέχη σε μέσο Microcosm. Σε ορισμένα δείγματα, ο τραυματισμός είναι 100%, δηλαδή όλα τα κύτταρα του πληθυσμού την δεδομένη στιγμή ήταν τραυματισμένα. Ο τραυματισμός στο μέσο Ringer αλλάζει και εξαρτάται περισσότερο από την θερμοκρασία και όχι τόσο από το στέλεχος. Ο τραυματισμός στο μέσο Microcosm αλλάζει ανάλογα με το στέλεχος αλλά και με την θερμοκρασία.

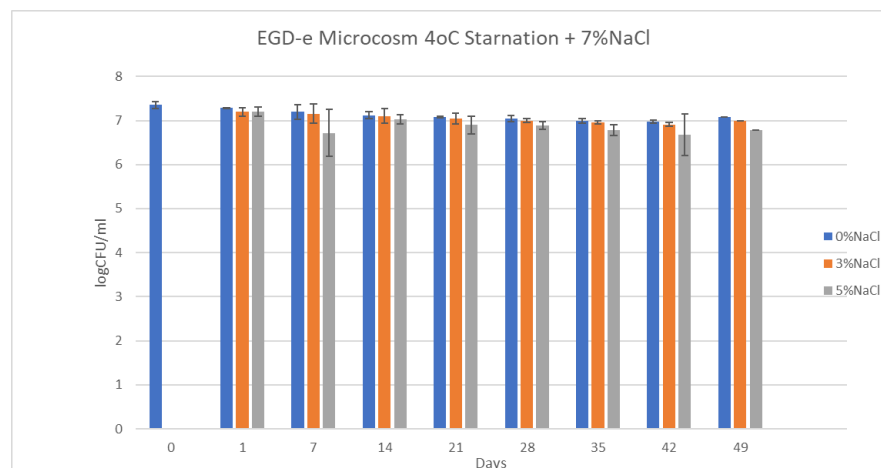


Εικόνα 3.38 και 3.39. Σύγκριση του τραυματισμού στα δύο στελέχη *Listeria monocytogenes* στα μέσα Ringer και Microcosm όταν τα κύτταρα βιώνουν λιμό στους 4°C (πάνω) και στους 20°C (κάτω).

Υπό συνθήκες λιμού, τα στελέχη ScottA και EGD-e του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* επιβιώνουν για 8 εβδομάδες στα μέσα Ringer και Microcosm και σε θερμοκρασίες επώασης 4°C και 20°C, με εξαίρεση το στέλεχος ScottA σε Microcosm στους 20°C. Το μικροβιακό φορτίο των ζωντανών κυττάρων στους 4°C μειώνεται πιο αργά συγκριτικά με τους 20°C. Αυτός ο διαχωρισμός ωστόσο δεν είναι τόσο σαφής όταν αναφερόμαστε στον τραυματισμό. Ο τραυματισμός που παρουσιάζει κάθε στέλεχος μεταβάλλεται ανάλογα με το μέσο και την θερμοκρασία επώασης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ανεξάρτητα από το ποσοστό του τραυματισμού τις πρώτες εβδομάδες του πειράματος, παρατηρείται αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που είναι υποθανάτια τραυματισμένα από την τέταρτη εβδομάδα του πειράματος έως το τέλος (όγδοη εβδομάδα). Ο τραυματισμός είναι μέγιστος στην τελευταία δειγματοληψία. Παράδειγμα της παραπάνω παρατήρησης αποτελούν τα στελέχη σε Ringer στους 4°C όπου το ποσοστό των τραυματισμένων κυττάρων αυξάνεται από την 5^η εβδομάδα, όπως ήδη συζητήθηκε, το στέλεχος ScottA σε Microcosm 20°C, όπου ο τραυματισμός αυξάνεται από την 3^η εβδομάδα, το EGD-e σε Microcosm στους 20°C, όπου ο τραυματισμός αυξάνεται από την 4^η εβδομάδα (γράφημα 3.39). Αυτή η παρατήρηση ισχύει τόσο σε περιπτώσεις που ο πληθυσμός των κυττάρων μένει σταθερός όσο και στις περιπτώσεις που αυτός μειώνεται με την έκθεση των βακτηρίων στην καταπόνηση.

3.6 Αξιολόγηση του υποθανάτιου τραυματισμού στα στελέχη ScottA και EGD-e του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* έπειτα από καταπόνηση λόγω έλλειψης θρεπτικών συστατικών και παρουσίας 7% NaCl.

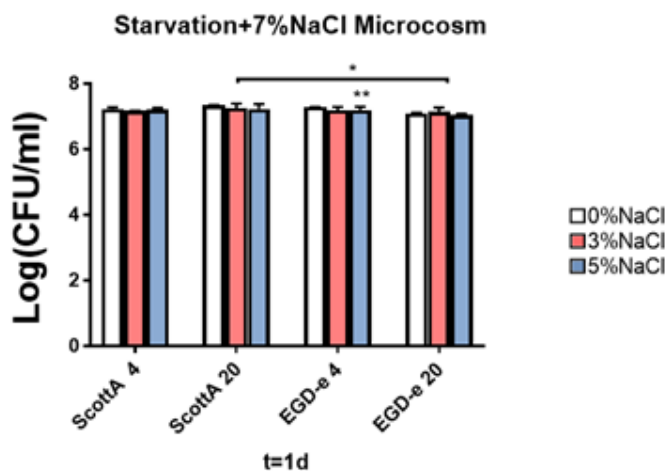
Από τα κύτταρα τα οποία εκτέθηκαν σε Ringer και Microcosm παρουσία 7%NaCl, παρέμειναν βιώσιμοι υποπληθυσμοί ως το πέρας του πειράματος, το οποίο διήρκησε 8 εβδομάδες. Αναφορικά με την θανάτωση, υπήρχαν 3 περιπτώσεις όπου η μείωση δεν ξεπέρασε το 1log (Γράφημα 3.40). Αυτές είναι το στέλεχος EGD-e στους 4°C και στα δύο μέσα και το ScottA στους 4°C σε μέσο Microcosm. Στο Ringer στο στέλεχος ScottA στους 4°C ο πληθυσμός μειώνονταν σταδιακά και η μείωση κατά 1log επήλθε την τελευταία εβδομάδα του πειράματος. Στους 20°C, όλα τα στελέχη σε όλα τα μέσα επιβίωσαν, ωστόσο μειώθηκαν κατά 1log σημαντικά νωρίτερα, την ημέρα 14 για τα δείγματα ScottA Ringer, ScottA Microcosm, EGD-e Microcosm και την ημέρα 21 για τα δείγματα EGD-e Ringer.



Γράφημα 3.40:
Μείωση του πληθυσμού του στελέχους EGD-e *Listeria monocytogenes* σε Microcosm στους 4°C, για 49 ημέρες.

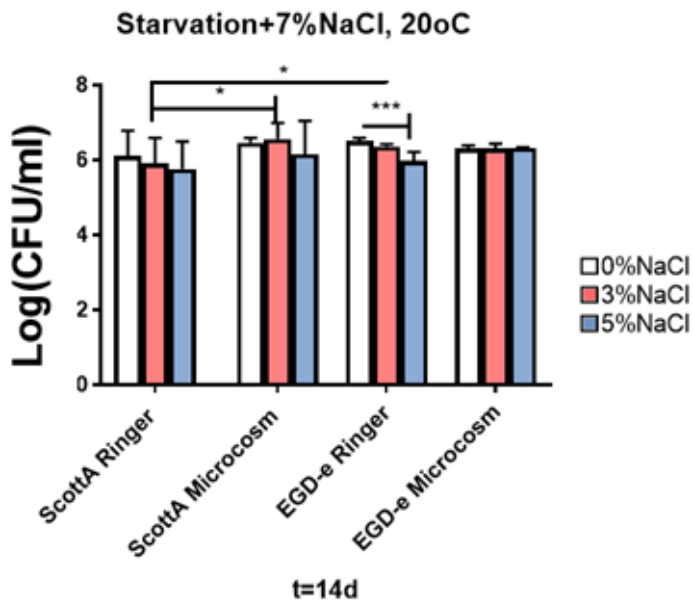
Αναφορικά με τον τραυματισμό, τα δείγματα στους 4°C περιείχαν μικρότερο ποσοστό τραυματισμένων κυττάρων συγκριτικά με τα δείγματα στους 20°C σχεδόν σε όλα τα χρονικά σημεία. Η διαφορά μεταξύ των δύο θερμοκρασιών είναι ιδιαίτερα έντονη στην περίπτωση του στελέχους ScottA.

Όταν τα κύτταρα *Listeria monocytogenes* εκτέθηκαν αρχικά στην συνθήκη καταπόνησης, δεν παρατηρήθηκε τραυματισμός. Το στέλεχος EGD-e σε Microcosm στους 4°C παρουσιάζει αρχικό τραυματισμό ο οποίος είναι στατιστικά σημαντικός, τα τραυματισμένα κύτταρα ωστόσο απαρτίζουν το 17,83% του συνολικού βακτηριακού πληθυσμού. Στο μέσο Microcosm από την πρώτη μέρα έκθεσης στην καταπόνηση εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των στελεχών (Γράφημα 3.41).



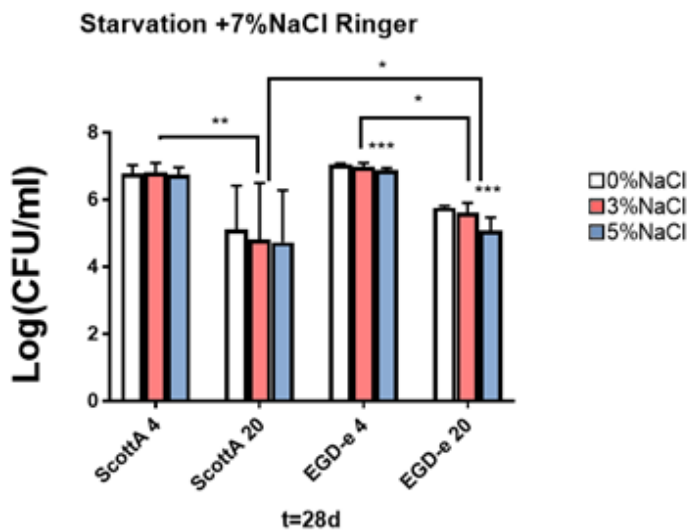
Γράφημα 3.41. Θανάτωση και τραυματισμός των στελεχών ScottA και EGD-e του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε Microcosm σε 24 ώρες (1 ημέρα) έκθεσης σε λιμό με προσθήκη 7% NaCl. Με * και ** συμβολίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ διαφορετικών ομάδων.

Έπειτα από 14 μέρες σε έλλειψη θρεπτικών και παρουσία 7%NaCl, εμφανίζονται στους 20°C στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ των μέσων διάλυσης όσο και μεταξύ των στελεχών. Το στέλεχος EGD-e σε Ringer παρουσιάζει στατιστικά σημαντικό τραυματισμό (γράφημα 3.42) με το ποσοστό των τραυματισμένων κυττάρων να είναι 59,27%, το ίδιο στέλεχος εμφανίζει στατιστικά σημαντικό τραυματισμό στους 4°C και στα δύο μέσα (Πίνακας 5-Υπόμνημα).



Γράφημα 3.42. Θανάτωση και τραυματισμός των στελεχών ScottA και EGD-e του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* στους 20°C έπειτα από 14 ημέρες (2 εβδομάδες) έκθεσης σε λιμό με προσθήκη 7% NaCl. Με *, ** και *** συμβολίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ διαφορετικών ομάδων.

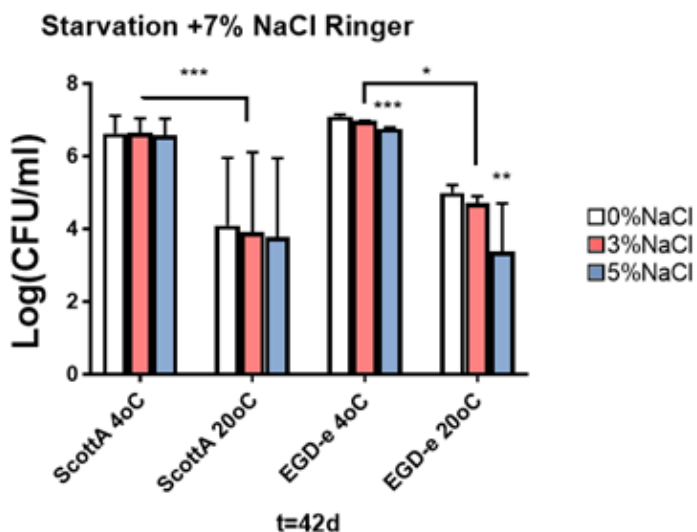
Έπειτα από έκθεση στην καταπόνηση για τέσσερις εβδομάδες στα δύο μέσα, και τα δύο στελέχη εμφάνισαν στατιστικά σημαντική μείωση στο πληθυσμιακό μέγεθος των ζωντανών κυττάρων όταν επωάζονταν στους 20°C, παρόλα αυτά μόνο το στέλεχος EGD-e είχε στατιστικά σημαντικό τραυματισμό (Γράφημα 3.43, Πίνακας 5-Υπόμνημα).



Γράφημα 3.43. Θανάτωση και τραυματισμός των στελεχών ScottA και EGD-e του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* στο μέσο Ringer έπειτα από 28 ημέρες (4 εβδομάδες) έκθεσης σε λιμό με προσθήκη 7% NaCl. Με *, ** και *** συμβολίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ διαφορετικών ομάδων.

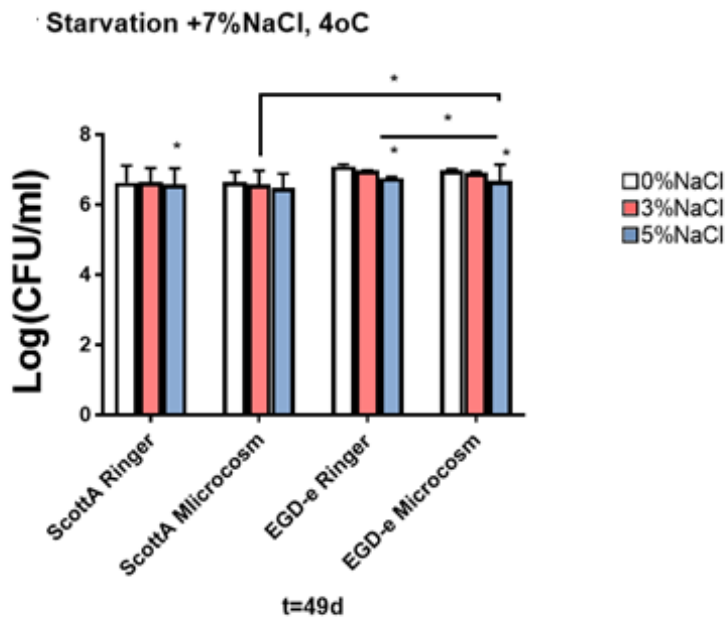
Στις 6 εβδομάδες (42 ημέρες) υπό καταπόνηση, εμφανίζεται στατιστικά σημαντικός τραυματισμός στο στέλεχος EGD-e στο μέσο Ringer στους 4 °C (53,69%) και στους 20°C

(67,26%)(γράφημα 3.44). Παράλληλα και στα δύο στελέχη σημειώνονται στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο θερμοκρασίες.



Γράφημα 3.44. Θανάτωση και τραυματισμός των στελεχών ScottA και EGD-e του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* στο μέσο Ringer έπειτα από 42 ημέρες (6 εβδομάδες) έκθεσης σε λιμό με προσθήκη 7% NaCl. Με *, ** και *** συμβολίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ διαφορετικών ομάδων.

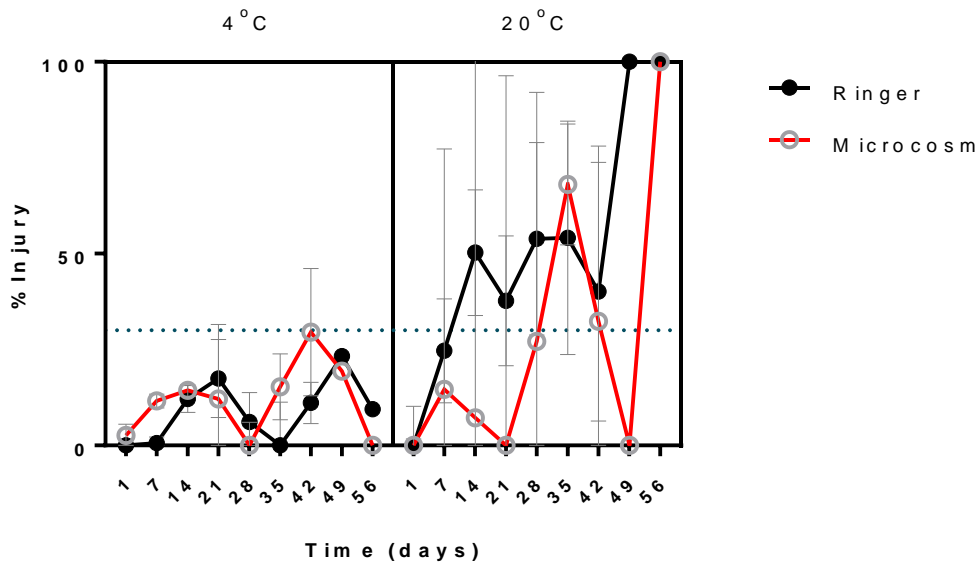
Στις 7 εβδομάδες (49 ημέρες) υπό καταπόνηση, εμφανίζεται στατιστικά σημαντικός τραυματισμός στο στέλεχος EGD-e στα δύο μέσα στους 4°C (71,58% στο μέσο Ringer και 47,92% στο Microcosm) και στο στέλεχος ScottA σε Ringer στους 4°C ο οποίος είναι ωστόσο χαμηλός (23,31%). Σημειώνονται επίσης στατιστικά σημαντικής διαφορά ανάμεσα στα δύο μέσα διάλυσης για το EGD-e και ανάμεσα στα δύο στελέχη για το μέσο Microcosm (γράφημα 3.45).



Γράφημα 3.45. Θανάτωση και τραυματισμός των στελεχών ScottA και EGD-e του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* στους 4°C έπειτα από 49 ημέρες (7 εβδομάδες) έκθεσης σε λιμό με προσθήκη 7% NaCl. Με * συμβολίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ διαφορετικών ομάδων.

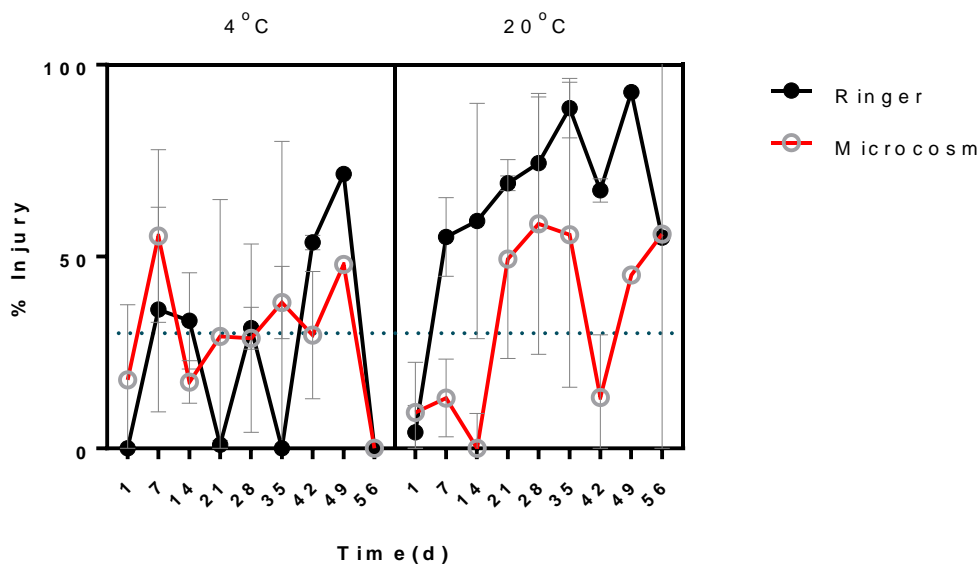
Με την πάροδο του χρόνου, το μέγεθος του πληθυσμού των ζωντανών κυττάρων στα δείγματα στους 4°C παραμένει σταθερό. Ο τραυματισμός σε αυτήν την θερμοκρασία είναι μη σημαντικός στο στέλεχος ScottA, στο μέσο Ringer το μεγαλύτερο ποσοστό υποθανάτιου τραυματισμού είναι 23,31% και παρατηρείται την 7^η εβδομάδα καταπόνησης ενώ στο μέσο Microcosm είναι 29,53% στην 6^η εβδομάδα (γράφημα 3.46). Στο στέλεχος EGD-e στους 4°C το υψηλότερο ποσοστό των τραυματισμένων κυττάρων στα δείγματα είναι 71,58% στο μέσο Ringer την 7^η εβδομάδα και 55,36% στο Microcosm την 2^η εβδομάδα (γράφημα 3.47). Στους 20°C, υπάρχει τραυματισμός και στα δύο στελέχη, και ιδιαίτερα στο EGD-e (Γράφημα 3.47, 3.48). Στο μέσο Ringer στο στέλεχος EGD-e στους 20°C, το μεγαλύτερο ποσοστό υποθανάτιου τραυματισμού είναι 92,90% την 7^η εβδομάδα, ενώ στο μέσο Microcosm 58,86% την 8^η εβδομάδα. Στο ScottA στο μέσο Ringer στους 20°C, το μεγαλύτερο ποσοστό υποθανάτιου τραυματισμού είναι 100% την 7^η εβδομάδα, ενώ στο μέσο Microcosm 68,02% την 5^η εβδομάδα. Φαίνεται ότι στην συγκεκριμένη καταπόνηση η θερμοκρασία επώασης και όχι τόσο το μέσο, καθορίζουν τον τραυματισμό των κυττάρων (γράφημα 3.46, 3.48).

% Injury Starvation +7% NaCl ScottA



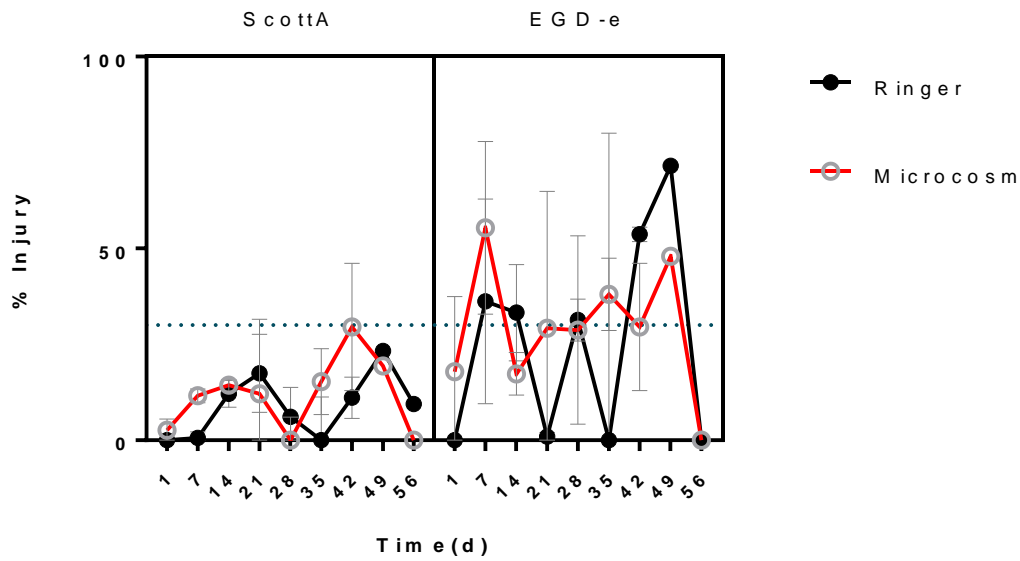
Γράφημα 3.46 Σύγκριση του τραυματισμού στα δύο μέσα και θερμοκρασίες επώασης για το στέλεχος ScottA *Listeria monocytogenes*. Στην χαμηλότερη θερμοκρασία ο τραυματισμός είναι μικρότερος σε κλίμακα και το μέσο φαίνεται να μην δημιουργεί σημαντική διαφοροποίηση στην συμπεριφορά των κυττάρων. Σε υψηλότερη θερμοκρασία ο τραυματισμός αυξάνεται και διαφοροποιείται ανάλογα με το μέσο.

% Sublethal Injury Starvation +7% NaCl EGD-e



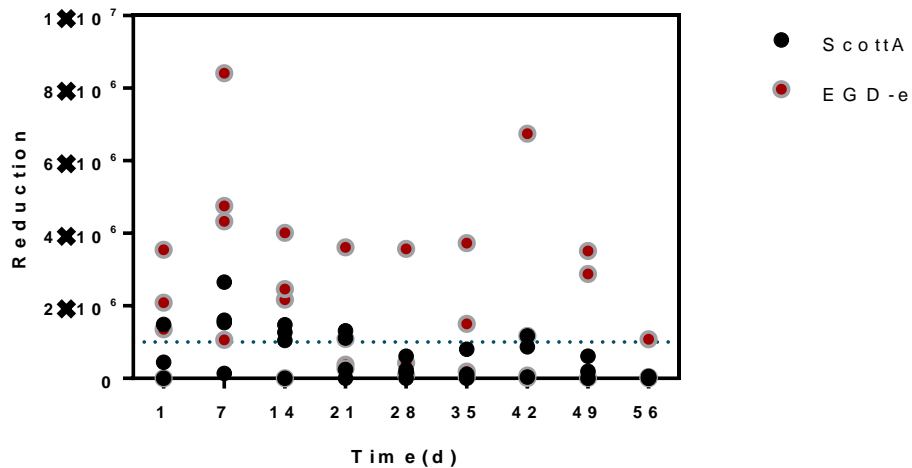
Γράφημα 3.47 Σύγκριση του τραυματισμού στα δύο μέσα και θερμοκρασίες επώασης για το στέλεχος ScottA *Listeria monocytogenes*. Ο τραυματισμός είναι μεγαλύτερος στο μέσο Ringer συγκριτικά με το Microcosm. Στο Ringer ο τραυματισμός στους 4°C είναι χαμηλότερος συγκριτικά με τους 20°C

% Sublethal Injury Starvation + 7% NaCl 4°C



Γράφημα 3.48 Σύγκριση του τραυματισμού στα δύο στελέχη και μέσα στους 4°C. Στο ScottA ο τραυματισμός είναι παρόμοιος για τα δύο μέσα. Στο EDD-e ο τραυματισμός είναι σε κάθε περίπτωση πιο έντονος.

Strain Variation effect on sublethal injury, Starvation + 7% NaCl



Γράφημα 3.49. Τραυματισμός logCFU 0% TSAYE- logCFU 5% TSAYE+NaC στα δύο στελέχη ScottA και EGD-e στον μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*. Στο ScottA ο τραυματισμός είναι σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις μικρότερος από το EGD-e. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο δύο βιολογικών και δύο τεχνικών επαναλήψεων.

Συνοψίζοντας, τα δείγματα είχαν συνολικά μικρότερο τραυματισμό στους 4°C από ότι στους 20°C. Ωστόσο ο τραυματισμός διέφερε σημαντικά ανάμεσα στα στελέχη. Το στέλεχος EGD-e παρουσίασε σε κάθε χρονική στιγμή, θερμοκρασία και μέσο στατιστικά σημαντικό τραυματισμό, με ελάχιστες εξαιρέσεις (Πίνακας 5-Υπόμνημα).

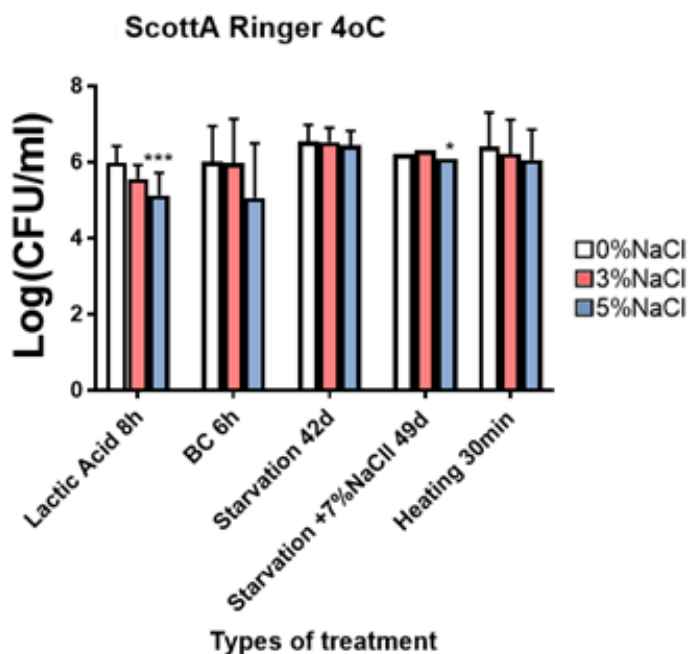
Στα δύο στελέχη στους 4°C τα επίπεδα του τραυματισμού ήταν στην παρόμοια για τα δύο μέσα διάλυσης. Στους 20°C το Ringer παρουσίαζε μεγαλύτερο τραυματισμό από ότι τα αντίστοιχα δείγματα σε Microcosm (Γράφημα 3.46, 3.47). Σε αντίθεση με παρατηρήσεις που αφορούν τις προηγούμενες καταπονήσεις, δεν βρέθηκε κανένα δείγμα στο οποίο ο τραυματισμός αυξάνεται όλο το χρονικό διάστημα έκθεσης στην καταπόνηση και εν τέλει μεγιστοποιείται, δηλαδή στην τελευταία δειγματοληψία, το ποσοστό των υποθανάτια τραυματισμένων κυττάρων είναι μεγαλύτερο από κάθε άλλη χρονική στιγμή. Αντίθετα, η δοθείσα καταπόνηση είναι εκείνη που ο πληθυσμός έμεινε σχεδόν σταθερός σε μεγάλο μέρος των δειγμάτων. Ο τραυματισμός όμως παρουσίασε διακυμάνσεις -με εξαίρεση το στέλεχος ScottA στους 4 °C όπου δεν ξεπέρασε το 30% -και σε γενικές γραμμές το πείραμα έληξε με μηδενικό ή ελάχιστο τραυματισμό. Η μείωση του πληθυσμού των ζωντανών κυττάρων, υγείων και τραυματισμένων, φαίνεται ότι εξαρτάται από την θερμοκρασία επώασης, ωστόσο ο υποθανάτιος τραυματισμός διαφέρει ανάλογα με το στέλεχος. Το μέσο δεν φαίνεται σε κάθε περίπτωση να έχει επίδραση στον τραυματισμό. Ωστόσο στο στέλεχος EGD-e στους 20 °C τα δείγματα σε Ringer είναι για κάθε χρονική στιγμή περισσότερο τραυματισμένα από τα δείγματα σε Microcosm, όπως παρουσιάζεται στο γράφημα 3.47.

3.7 Σύγκριση της επιβίωσης και του υποθανάτιου τραυματισμού μεταξύ των διαφορετικών καταπονήσεων στα στελέχη ScottA και EGD-e του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*.

Σε αυτό το κεφάλαιο γίνεται σύγκριση ως ένα σημείο του υποθανάτιου τραυματισμού μεταξύ διαφορετικών καταπονήσεων στις ίδιες συνθήκες, και ειδικότερα μεταξύ του λιμού απουσία και παρουσία άλατος. Κυρίως όμως θα αντιπαραθέσουμε τις συνθήκες που οδήγησαν σε υποθανάτιο τραυματισμό.

3.7.1.Επίδραση της καταπόνησης στον υποθανάτιο τραυματισμό

Καθώς ο τραυματισμός ανά καταπόνηση μελετήθηκε σε διαφορετικά χρονικά σημεία, για κάθε περίπτωση αντιπαρατίθεται στο χρονικό σημείο που ο πληθυσμός ζώντων κυττάρων έχει μειωθεί κατά 1log. Στο στέλεχος ScottA σε Ringer επωασμένο στους 4°C, η μείωση επήλθε στις 8 ώρες στην όξινη καταπόνηση, στις 6 ώρες στην καταπόνηση με απολυμαντικό, στις 42 ημέρες στον λιμό και στις 49 ημέρες στον λιμό σε συνδυασμό με ωσμωτική καταπόνηση. Στην περίπτωση της όξινης καταπόνησης και του λιμού με προσθήκη άλατος, η μείωση του πληθυσμού συνοδεύεται από σημαντικό τραυματισμό. Αντίθετα, στα πειράματα όπου τα κύτταρα εκτίθενται σε Benzalkonium Chloride ή βιώνουν λιμό, ο υποθανάτιος τραυματισμός είναι είτε μη σημαντικός είτε μηδενικός. Στο γράφημα 3.50 παρουσιάζεται επίσης η επιβίωση και ο τραυματισμός του στελέχους ScottA σε Ringer, για την θερμική καταπόνηση, ωστόσο στο συγκεκριμένο πείραμα τα δείγματα σαφώς δεν επώαστηκαν στους 4°C και τους 20°C. Είναι αναμενόμενο κάτω από διαφορετικού τύπου καταπόνηση τα κύτταρα να παρουσιάσουν διαφορετική συμπεριφορά. Κάθε καταπόνηση δρα με διαφορετικό τρόπο και σε διαφορετικούς τόπους στο κύτταρο, και έτσι ο μικροοργανισμός βιώνει ανά περίπτωση φυσιολογικές μεταβολές. Η ικανότητα του κυττάρου να ανταπεξέλθει στην καταπόνηση, καθορίζει την θανάτωση και τον τραυματισμό των κυττάρων που συγκροτούν έναν μικροβιακό πληθυσμό.

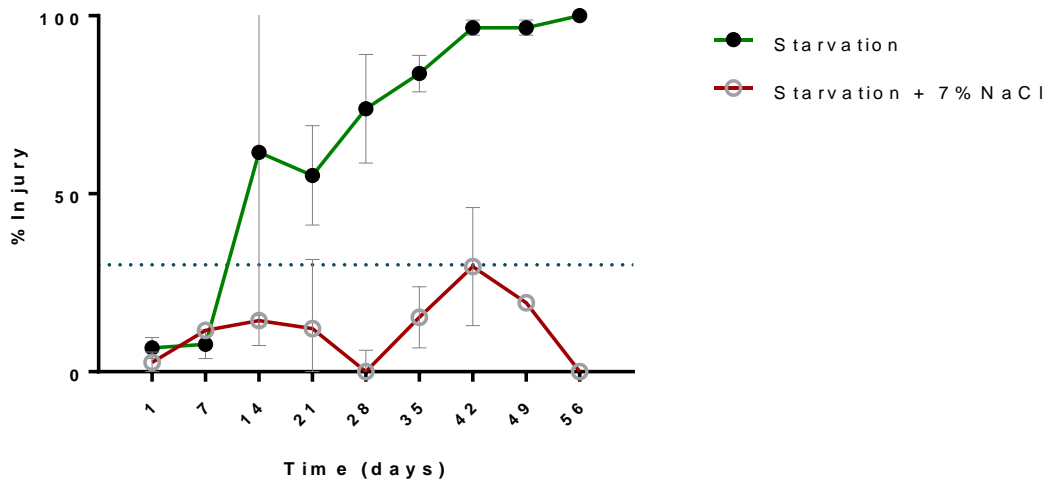


Γράφημα 3.50. Ο υποθανάτιος τραυματισμός όταν ο πληθυσμός έχει μειωθεί κατά 1log, στο δείγμα ScottA Ringer 4°C. Η όξινη καταπόνηση παρουσιάζεται στις 8 ώρες, το απολυμαντικό στις 6 ώρες, ο λιμός στις 42 ημέρες, ο λιμός σε συνδυασμό με ωσμωτική καταπόνηση στις 49 ημέρες, και η θερμική καταπόνηση στα 30 λεπτά.

3.7.2 Επίδραση της προσθήκης άλατος στον τραυματισμό που προκαλείται από παραμονή σε λιμό.

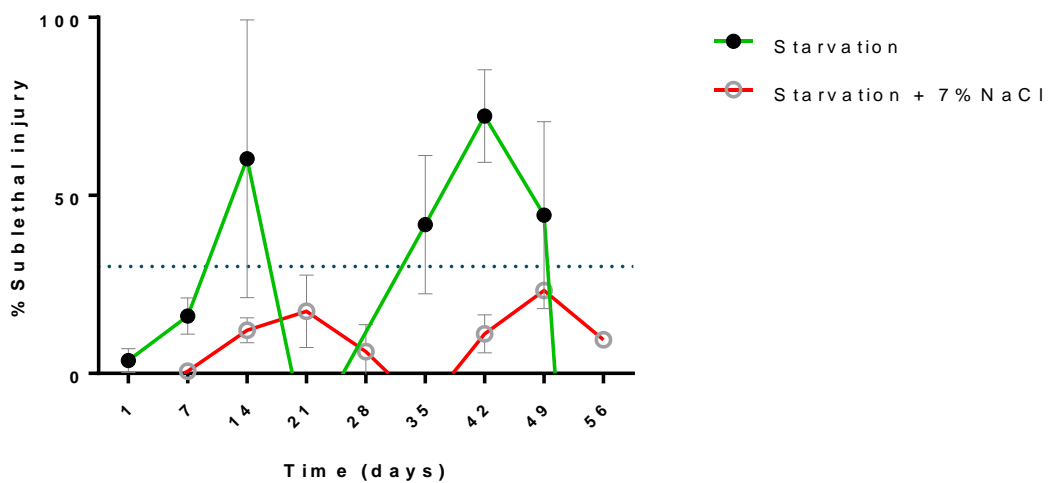
Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τα πειράματα του λιμού και του λιμού σε συνδυασμό με 7%NaCl, γίνεται σαφές ότι η έκθεση βακτηριακών κυττάρων *Listeria monocytogenes* στην συγκεκριμένη καταπόνηση προκαλεί τραυματισμό στα κύτταρα. Η μείωση του μικροβιακού πληθυσμού κατά 1log συνέβη πάντα στον λιμό παρουσία άλατος σε ύστερο χρόνο συγκριτικά με τον λιμό. Ομοίως, υποθανάτιος τραυματισμός ήταν μικρότερος στην περίπτωση που ο λιμός συνδυάζεται με ωσμωτική καταπόνηση λόγω του άλατος. Σε πολλά δείγματα το μέγεθος του τραυματισμού διαφέρει όμως παρατηρούνται ομοιότητες αναφορικά με την πορεία του τραυματισμού σε σχέση με τον χρόνο. Στο γράφημα 3.51 και 3.52 παρουσιάζεται ο τραυματισμός του στελέχους ScottA σε Microcosm και σε Ringer στους 4°C έπειτα από έκθεση στις δύο καταπονήσεις. Η προσθήκη άλατος κατά την παραμονή σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών, φαίνεται να λειτουργήσει προστατευτικά για τα κύτταρα από άποψη επιβίωσης και τραυματισμού.

% Sublethal Injury ScottA Microcosm 4 °C



Γράφημα 3.51 Σύγκριση του υποθανάτιου τραυματισμού στην καταπόνηση λιμού και λιμού με προσθήκη άλατος στο δείγμα ScottA Microcosm 4°C.

% Sublethal Injury ScottA Ringer 4 °C



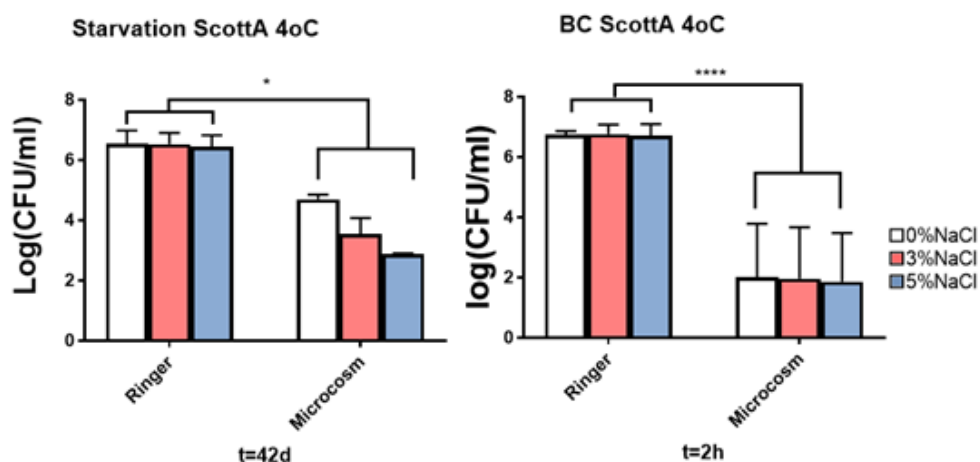
Γράφημα 3.52 Σύγκριση του υποθανάτιου τραυματισμού στην καταπόνηση λιμού και λιμού με προσθήκη άλατος στο δείγμα ScottA Ringer 4°C.

3.7.3 Σύγκριση των συνθηκών που οδήγησαν σε υποθανάτιο τραυματισμό ανά περίπτωση.

Όπως παρουσιάζεται στα αντίστοιχα κεφάλαια, όλες οι συνθήκες καταπόνησης προκάλεσαν υποθανάτιο τραυματισμό στα κύτταρα κατά τον χρόνο έκθεσης δύο στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*.

Το μέσο επώασης του μικροοργανισμού αποτελεί στις περισσότερες περιπτώσεις καθοριστικό παράγοντα για την πρόκληση του τραυματισμού. Αυτό ισχύει στην όξινη καταπόνηση, ανά χρονικές στιγμές, όπου ο τραυματισμός ήταν εντονότερος στο μέσο Microcosm συγκριτικά με το Ringer, στους 4°C. Ωστόσο το αντίθετο βρέθηκε αναφορικά με

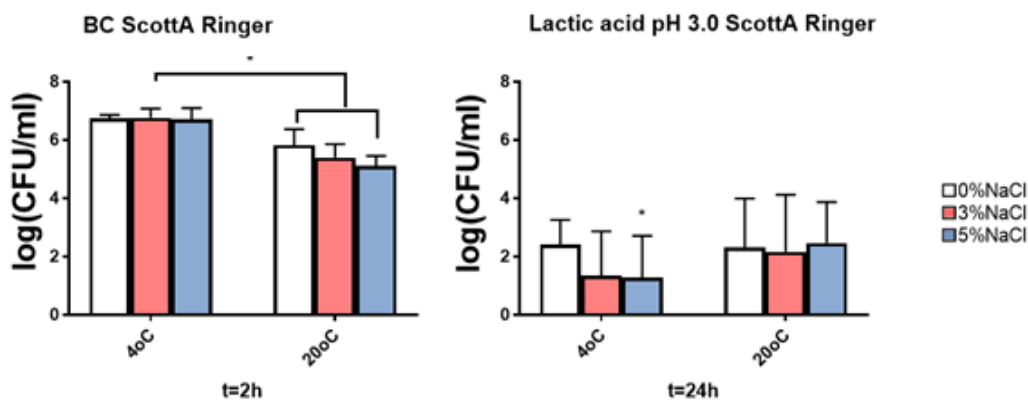
την μείωση του πληθυσμού στα τελευταία χρονικά σημεία των πειραμάτων. Κατά την έκθεση των κυττάρων στον απολυμαντικό παράγοντα BC, ο τραυματισμός που παρατηρήθηκε στα βακτήρια επωασμένα σε Microcosm είναι εντονότερος συγκριτικά με εκείνα σε Ringer, στους 20 °C. Εκτός από τραυματισμό, το μικροβιακό φορτίο μειώνεται ααπότομα και μέχρι το τέλος του πειράματος στα δείγματα σε Microcosm και στις δύο θερμοκρασίες. Η ίδια παρατήρηση, όπου το Microcosm σχετίζεται με εντονότερο τραυματισμό, ισχύει και στην καταπόνηση λιμού, και στις δύο θερμοκρασίες. Ωστόσο στα δείγματα EGD-e στους 20 °C, στο μέσο Ringer υπάρχει μεγαλύτερο ποσοστό τραυματισμένων κυττάρων σε σχέση με το Microcosm, στην καταπόνηση λιμού με προσθήκη άλατος. Το μέσο Microcosm δεν περιέχει άλατα και έτσι τα κύτταρα που προστίθενται σε αυτό βρίσκονται σε ωσμωτική ανισορροπία βιώνοντας έτσι ελαφρά ωσμωτική καταπόνηση. Ίσως στην περίπτωση λιμού με προσθήκη άλατος, το αλάτι χρησιμοποιήθηκε ως ένα βαθμό από τα κύτταρα για να επιτευχθεί η σπαργή, καταργώντας έτσι την ειδοποιό διαφορά ανάμεσα στα δύο μέσα. Στην θερμική καταπόνηση δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δύο μέσα επώασης. Για κάθε στέλεχος διαφορετικό μέσο εμφάνισε κάθε φορά μεγαλύτερο ποσοστό τραυματισμένων κυττάρων. Στο γράφημα 3.53 παρατίθενται ενδεικτικά δύο καταπονήσεις στις ίδιες πειραματικές συνθήκες όπου τα δύο μέσα παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά αναφορικά με την επιβίωση των κυττάρων *L. monocytogenes*.



Γράφημα 3.53. Υποθανάτιος τραυματισμός στα μέσα Ringer και Microcosm στο στέλεχος ScottA, 4°C υπό καταπόνηση λιμού (αριστερά) και δράση απολυμαντικού (δεξιά).

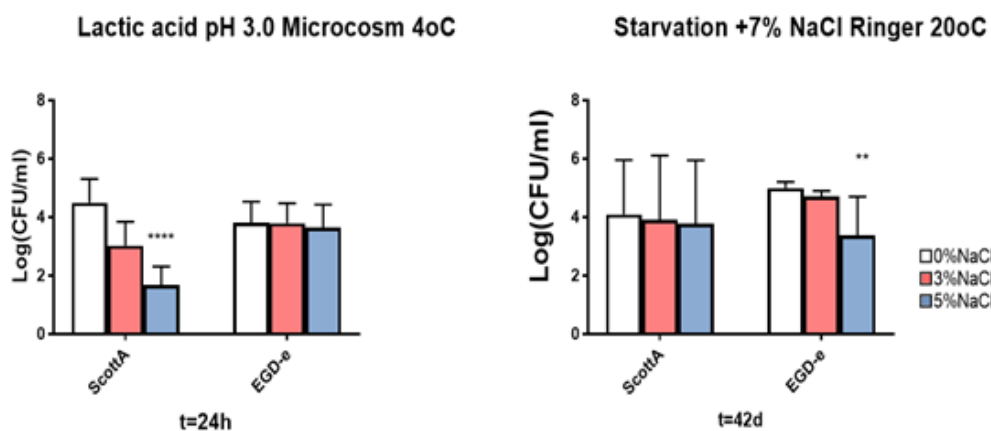
Η θερμοκρασία επώασης αποδείχθηκε σημαντικός παράγοντας στην μελέτη του τραυματισμού σε όλα τα είδη των καταπονήσεων. Στην όξινη καταπόνηση με προσθήκη γαλακτικού οξέος, παρατηρήθηκε εντονότερος τραυματισμός στα κύτταρα που επώαστηκαν στους 4°C από αυτά που επώαστηκαν στους 20 °C. Αντίθετα, στην καταπόνηση από τον παράγοντα BC, παρατηρήθηκε εντονότερος τραυματισμός στα δείγματα που επώαστηκαν στους 20 °C. Η ίδια παρατήρηση ισχύει και στον λιμό με προσθήκη ωσμωτικής καταπόνησης, όπου κατά περιπτώσεις, για παράδειγμα στα δείγματα του στελέχους ScottA και στο μέσο Ringer, προκαλείται εντονότερος τραυματισμός στους 20°C. Η θερμοκρασία είναι σημαντικός παράγοντας και για τον τραυματισμό στον λιμό, η επίδραση της ωστόσο αλλάζει στα διαφορετικά μέσα και στελέχη. Ο μικροβιακός πληθυσμός που επώαστηκε στους 4°C

μειώθηκε σημαντικά αργότερα από αυτόν στους 20°C στα πειράματα που περιλαμβάνουν λιμό. Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά δύο καταπνήσεις στις ίδιες πειραματικές συνθήκες όπου τα βακτήρια εμφάνισαν (BC) ή δεν εμφάνισαν (όξινο στρες) στατιστικά σημαντική διαφορά όταν επωάζονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες αναφορικά με την επιβίωση των κυττάρων *L. monocytogenes*.



Γράφημα 3.54. Υποθανάτιος τραυματισμός στις θερμοκρασίες 4 και 20 παρουσία BC(αριστερά) και όξινης καταπύησης (δεξιά) στο στέλεχος ScottA επωασμένο στο μέσο Ringer.

Διαφοροποίηση μεταξύ των δύο στελεχών, αλλά και έλλειψη αυτής, συναντάται συχνά στην παρούσα μελέτη. Τα δύο στελέχη παρουσίασαν σημαντική διαφορά στην περίπτωση της καταπύησης λιμού με προσθήκη άλατος σε όλες τις θερμοκρασίες και τα μέσα καταπύησης. Στην μελέτη της όξινης καταπύησης τα δύο στελέχη διέφεραν σημαντικά ως προς τον τραυματισμό σε διαφορετικές θερμοκρασίες μέσα αλλά ομοιάζαν όταν επώαστηκαν στην ίδια θερμοκρασία και σε διαφορετικό μέσο. Ο τραυματισμός παρουσία BC διέφερε στο μέσο Ringer στους 20°C και στο μέσο Microcosm στους 4°C, ωστόσο υπήρχαν ομοιότητες μεταξύ των δύο στελεχών στο μέσο Microcosm στους 20°C και στο Ringer στους 4°C. Στον λιμό ο τραυματισμός των στελεχών ομοιάζε στο μέσο Ringer αλλά διαφοροποιήθηκε στο μέσο Microcosm. Σε αυτήν την περίπτωση, η διαφοροποίηση οφείλεται στο μέσο και όχι στην θερμοκρασία.



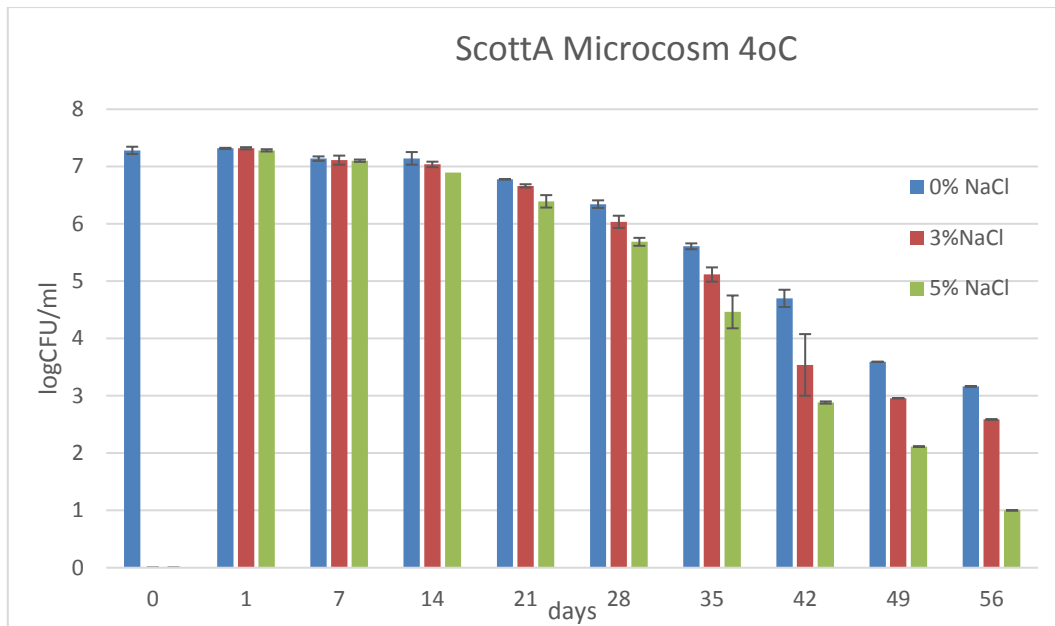
Γράφημα 3.55. Υποθανάτιος τραυματισμός στα στελέχη ScottA και EGD-e υπό όξινη καταπύηση (αριστερά) και υπό λιμό σε συνδυασμό με όξινη καταπύηση (δεξιά).

Αναφορικά με την πορεία του τραυματισμού σε σχέση με τον χρόνο, σε ορισμένα δείγματα παρατηρήθηκε ανοδική τάση, δηλαδή το ποσοστό των τραυματισμένων κυττάρων αυξάνεται όσο ο πληθυσμός εκτίθεται στην καταπόνηση, όπως φαίνεται στα γραφήματα 3.11, 3.19, και 3.33. Συχνά, στα πρώτα χρονικά σημεία του πειράματος παρατηρούνται αυξομειώσεις του τραυματισμού και τελική αύξηση σε επόμενες μετρήσεις (γραφήματα 3.34, 3.37 και 3.46). Υπήρξαν και δείγματα στα οποία ο τραυματισμός αυξάνονταν στα πρώτα χρονικά σημεία της καταπόνησης και έπειτα σταθεροποιούταν (γράφημα 3.28). Επίσης υπήρχαν περιπτώσεις όπου ο τραυματισμός μειώθηκε στα τελευταία χρονικά σημεία. (γράφημα 3.28, 3.34, 3.38, 3.48). Εάν ταυτόχρονα με την αύξηση του τραυματισμού ο πληθυσμός μένει σταθερός, αυτό μάλλον σημαίνει ότι περισσότερα κύτταρα τραυματίζονται αλλά δεν θανατώνονται όσο εκτίθενται στην καταπόνηση. Όταν ο βακτηριακός πληθυσμός μειώνεται, είναι επόμενο να παρουσιάζονται διακυμάνσεις στον τραυματισμό, καθώς η αναλογία τραυματισμένων/συνολικών κυττάρων αλλάζει. Σε χρονικές στιγμές που ανιχνεύεται μείωση του ποσοστού των τραυματισμένων κυττάρων ίσως περισσότερα τραυματισμένα κύτταρα θανατώνονται από ότι υγιή κύτταρα τραυματίζονται ή θανατώνονται. Αντίστοιχα όταν ανιχνεύεται αύξηση του τραυματισμού, πιθανώς περισσότερα κύτταρα τραυματίζονται από ότι θανατώνονται.

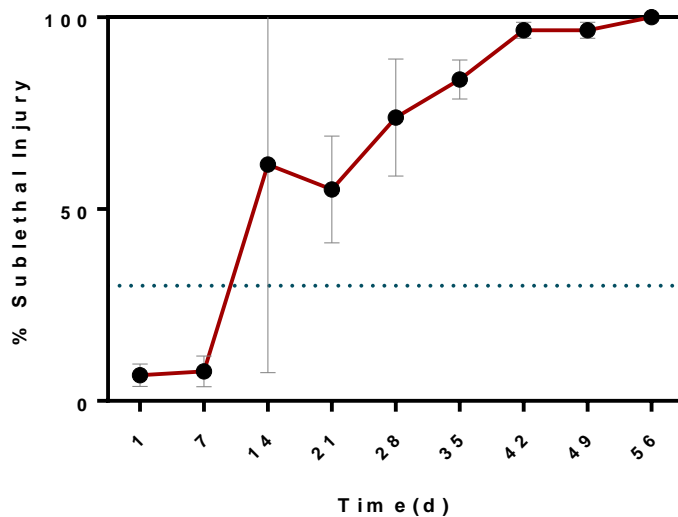
Η φαινομενικές διαφορές στα μεγέθη των υποπληθυσμών των βακτηρίων τα οποία υπόκεινται σε στρες, αναφορικά με τον τραυματισμό, ίσως υποδεικνύει διαφορετικές στρατηγικές του συστήματος με αποτέλεσμα τα κύτταρα να ανταπεξέλθουν σε συνθήκες καταπόνησης.

3.7.4 Σχέση του πληθυσμιακού μεγέθους με τον τραυματισμό

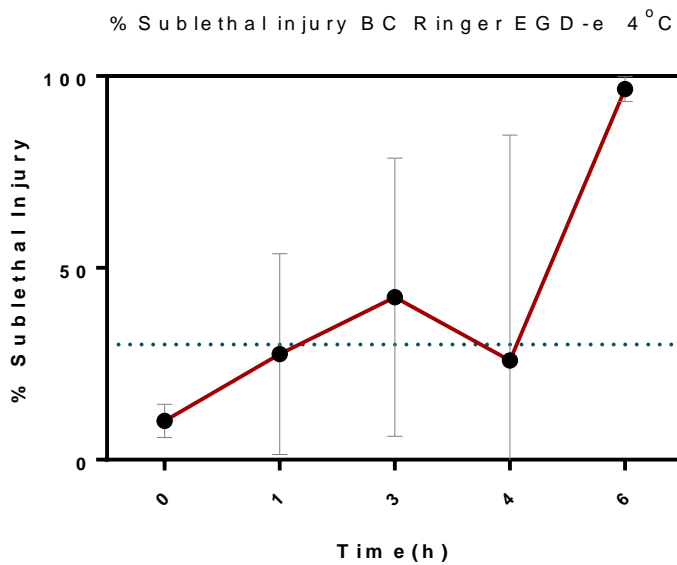
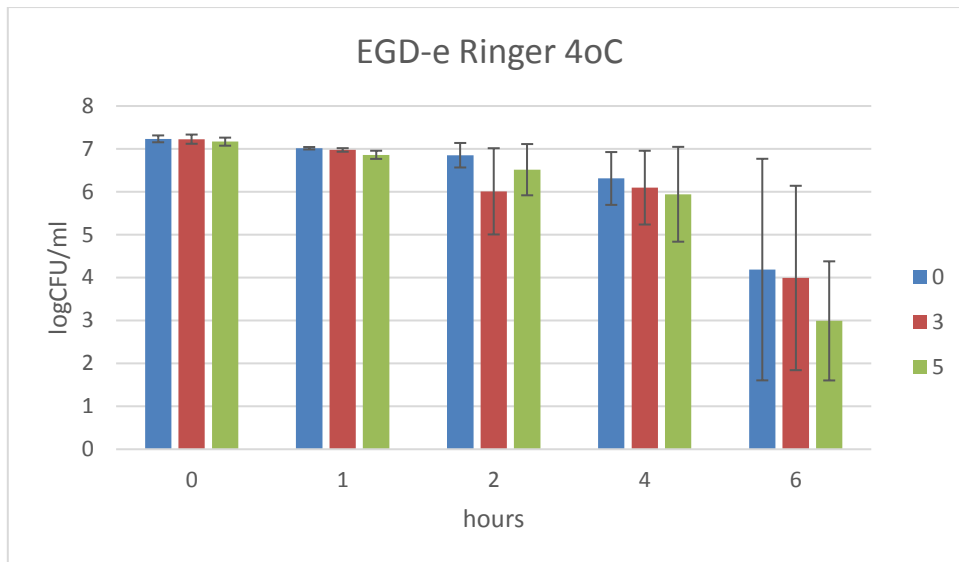
Μία τελευταία παρατήρηση αφορά τη μείωση του μέγεθος του πληθυσμού και τον ταυτόχρονο τραυματισμό. Η μείωση και ο τραυματισμός παρουσιάζεται να είναι ανεξάρτητα φαινόμενα. Παρουσία καταπόνησης ένας βακτηριακός πληθυσμός δύναται να είναι σταθερός σε μέγεθος αλλά να παρουσιάζει αυξομειώσεις στον τραυματισμό (γράφημα 3.46 και 3.47), και το αντίθετο, δηλαδή σε έναν πληθυσμό τα τραυματισμένα κύτταρα να είναι σχετικά σταθερά σε αριθμό ενώ το μικροβιακό φορτίο μειώνεται. Φυσικά είναι δυνατόν τόσο το μέγεθος όσο και ο τραυματισμός να παραμένουν σταθερά ή να μεταβάλλονται. Στις καταπονήσεις που μελετήθηκαν, συναντώνται όλοι οι παραπάνω συνδυασμοί.



% Sublethal injury Starvation ScottA Microcosm 4 °C



Γράφημα 3.56 (πάνω) και 3.57 (κάτω). Μείωση του πληθυσμού και υποθανάτιος τραυματισμός στο στέλεχος ScottA του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* που επωάζεται σε Microcosm στους 4°C σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών στοιχείων.



Γράφημα 3.58 (πάνω) και 3.59 (κάτω) . Μείωση του πληθυσμού και υποθανάτιος τραυματισμός στο στέλεχος EGD-e του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* που επωάζεται σε Ringer στους 4°C σε παρουσία του απολυμαντικού παράγοντα BC.

4. Συζήτηση

Οι καταπονήσεις που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία, όταν ασκήθηκαν η κάθε μία για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και ένταση, προκάλεσαν υποθανάτιο τραυματισμό στα κύτταρα του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*. Η έκθεση των βακτηρίων σε υποθανάτιας έντασης καταπονήσεις που σχετίζονται με την επεξεργασία τροφίμων και τους χώρους επεξεργασίας τροφίμων, δημιουργεί υποπληθυσμούς υγιών, τραυματισμένων και νεκρών κυττάρων. Το μέγεθος των υποπληθυσμών μεταβάλλεται σε κάθε περίπτωση όσο εντείνεται η έκθεση στην καταπόνηση. Κάθε καταπόνηση ανάλογα με τον τρόπο δράσης της σχετίζεται με διαφορετικές φυσιολογικές μετατροπές στα βακτηριακά κύτταρα που εκτίθενται σε αυτήν. Για αυτόν τον λόγο, οι καταπονήσεις διαφέρουν ως προς τον υποθανάτιο τραυματισμό που προκαλούν στα κύτταρα σε δεδομένο χρόνο και ένταση, αλλά και ως προς τις συνθήκες που δύναται να τον αναστείλουν ή να τον ενισχύσουν.

Η επιβίωση και ο υποθανάτιος τραυματισμός του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* όταν αρχικός πληθυσμός κυττάρων εκτίθεται σε όξινη καταπόνηση από γαλακτικό οξύ, pH 3.0 εξαρτάται από το μέσο, την θερμοκρασία και τα στελέχη που μελετώνται. Ιδιαίτερα το μέσο επώασης θεωρείται καθοριστικό για τον τραυματισμό των κυττάρων. Τα δείγματα που επώαστηκαν σε Microcosm έδειξαν μεγαλύτερο ποσοστό τραυματισμού συγκριτικά με το Ringer στους 4°C, και ο τραυματισμός των δειγμάτων στους 4°C ήταν περισσότερος από τον τραυματισμό των αντίστοιχων κυττάρων στους 20°C. Εντοπίστηκαν διαφοροποιήσεις μεταξύ των στελεχών αναφορικά με την επιβίωση και τον τραυματισμό, οι οποίες αποδίδονται στην θερμοκρασία. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αντίθετα με τα ευρήματα των Ahamad and Marth, 1989 και των Sibanda and Buys, 2017 που υποστηρίζουν ότι ο τραυματισμός που προκαλείται στον μικροοργανισμό *L. monocytogenes* παρουσία γαλακτικού οξέος pH 4.2, εξαρτάται μεν από την θερμοκρασία, ωστόσο, σε χαμηλότερες θερμοκρασίες προκαλείται μικρότερο ποσοστό τραυματισμού από ότι σε υψηλότερες. Επίσης, οι Ahamad and Marth, 1989 δεν σημειώνουν διαφοροποίηση μεταξύ των δύο στελεχών *L. monocytogenes* που μελέτησαν ενώ οι Sibanda and Buys, 2017 βρήκαν διαφοροποίηση ανάμεσα στα 4 στελέχη που μελέτησαν.

Στην περίπτωση του απολυμαντικού παράγοντα BC, η επιβίωση και ο υποθανάτιος τραυματισμός στα κύτταρα δύο στελεχών *Listeria monocytogenes* καθορίστηκαν από το μέσο εμβολιασμού και την θερμοκρασία. Ο υποθανάτιος τραυματισμός ήταν μεγαλύτερος στο μέσο Microcosm στους 20 °C στο πέρας της έκθεσης των κυττάρων στον παράγοντα καταπόνησης. Σε διαφορετικές συνθήκες τα στελέχη ομοιάζουν ή διαφέρουν ως προς τον τραυματισμό που εμφανίζουν. Οι Sallam and Donnelly, 1992, εντόπισαν διαφορές μεταξύ στελεχών ωστόσο η μελέτη αφορούσε διαφορετικά στελέχη, μέσα διάλυσης και απολυμαντικά της οικογένειας των QACs, αλλά όχι το BC.

Με θέρμανση των βακτηριακών κυττάρων *L. monocytogenes* στους 55°C για 120 λεπτά, δεν βρέθηκαν μεταξύ των δειγμάτων σε καμία χρονική στιγμή στατιστικά σημαντικές διαφορές αναφορικά με την μείωση του πληθυσμού. Τα κύτταρα του στελέχους ScottA εμφάνισαν περισσότερο τραυματισμό όταν διαλύθηκαν στο μέσο Ringer συγκριτικά με το Microcosm. Στο στέλεχος ScottA σε Ringer, ο τραυματισμός αυξήθηκε έπειτα από μισή ώρα καταπόνησης και παρέμεινε σχετικά σταθερός ως το τέλος του πειράματος. Στο Microcosm ο

τραυματισμός αυξάνεται έως τα 90 λεπτά καταπόνησης και έπειτα μηδενίζεται. Βιβλιογραφικά σημειώνεται ότι ο τραυματισμός φαίνεται να αυξάνεται όσο αυξάνεται η θερμοκρασία (Golden *et.al.*,1988, Miller *et.al.*, 2006, Wang *et.al.*,2017). Οι Golden *et.al.*, σύγκριναν την επιβίωση και τον τραυματισμό τεσσάρων στελεχών *L.monocytogenes* σε τρυπτόζη (tryptose phosphate broth και σημειώνουν ότι ο τραυματισμός διέφερε ανάλογα με το στέλεχος σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης (Golden *et.al.*,1988).

Υπό συνθήκες λιμού, τα στελέχη ScottA και EGD-e του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* επιβιώνουν για 8 εβδομάδες στα μέσα Ringer και Microcosm και σε θερμοκρασίες επώασης 4°C και 20°C, με εξαίρεση το στέλεχος ScottA σε Microcosm στους 20°C. Το μικροβιακό φορτίο των ζωντανών κυττάρων στους 4°C μειώνεται πιο αργά συγκριτικά με τους 20°C, όπως σημειώνει και η μελέτη του Dykes, 1999. Οι Jarvis *et.al.* μελέτησαν επίσης την επίδραση του λιμού στα στελέχη ScottA και EGD-e σε αποστειρωμένο νερό στους 4°C, με το ScottA να μειώνεται απότομα σε ορισμένα δείγματα, φαινόμενο που παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη (Jarvis *et.al.*,2017). Ο τραυματισμός που παρουσιάζει κάθε στέλεχος μεταβάλλεται ανάλογα με το μέσο και την θερμοκρασία επώασης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ανεξάρτητα από το ποσοστό του τραυματισμού τις πρώτες εβδομάδες του πειράματος, παρατηρείται αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που είναι υποθανάτια τραυματισμένα από την τέταρτη εβδομάδα του πειράματος έως το τέλος. Ο τραυματισμός είναι μέγιστος στην τελευταία δειγματοληψία. Αυτή η παρατήρηση ισχύει τόσο σε περιπτώσεις που ο πληθυσμός των κυττάρων μένει σταθερός όσο και στις περιπτώσεις που αυτός μειώνεται με την έκθεση των βακτηρίων στην καταπόνηση. Στην περίπτωση του λιμού με προσθήκη 7% NaCl, τα δείγματα είχαν συνολικά μικρότερο τραυματισμό στους 4°C από ότι στους 20°C. Ωστόσο ο τραυματισμός διέφερε σημαντικά ανάμεσα στα στελέχη. Στα δύο στελέχη στους 4°C τα επίπεδα του τραυματισμού ήταν παρόμοια για τα δύο μέσα διάλυσης. Ο πληθυσμός έμεινε σχεδόν σταθερός για 8 εβδομάδες σε μεγάλο μέρος των δειγμάτων. Ο τραυματισμός όμως παρουσίασε διακυμάνσεις και σε γενικές γραμμές το πείραμα έληξε με μηδενικό ή ελάχιστο υποθανάτιο τραυματισμό. Η μείωση του πληθυσμού των ζωντανών κυττάρων, υγείων και τραυματισμένων, φαίνεται ότι εξαρτάται από την θερμοκρασία επώασης, ωστόσο ο υποθανάτιος τραυματισμός διαφέρει ανάλογα με το στέλεχος. Το μέσο δεν φαίνεται σε κάθε περίπτωση να έχει επίδραση στον τραυματισμό. Ωστόσο στο στέλεχος EGD-e στους 20°C τα δείγματα σε Ringer είναι για κάθε χρονική στιγμή τραυματισμένα σε μεγαλύτερο ποσοστό από τα δείγματα σε Microcosm.

Συγκρίνοντας τα πειράματα λιμού, παρουσία και απουσία άλατος, όταν στα μέσα διάλυσης εισάγονταν 7%NaCl, ο τραυματισμός ήταν μικρότερος σε σχέση με την συνθήκη λιμού απουσία άλατος. Ο Dykes, 1999 μελέτησε στους 4°C το ίδιο ερώτημα, σύγκρινε δηλαδή τον υποθανάτιο τραυματισμό που προκαλείται σε λιμό παρουσία και απουσία άλατος χρησιμοποίησε ωστόσο διαφορετικό άλας από το NaCl και συμπέρανε ότι σε αυτήν την περίπτωση ο τραυματισμός αυξάνεται όταν ο λιμός συνδυάζεται με την παρουσία άλατος.

Το μέσο επώασης των κυττάρων καθόρισε στις περισσότερες καταπονήσεις τον υποθανάτιο τραυματισμό. Όπου βρέθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στον τραυματισμό που προκαλείται στα δύο μέσα, το Microcosm περιείχε μεγαλύτερο ποσοστό τραυματισμένων κυττάρων συγκριτικά με το Ringer. Η παρατήρηση αφορά όλες τις καταπονήσεις εκτός από τον λιμό με προσθήκη 7%NaCl. Πιθανώς η προσθήκη άλατος σε μέσο με απουσία άλατος δεν

δημιούργησε επιπλέον ωσμωτική καταπόνηση, όπως στις υπόλοιπες δοκιμές, αλλά αντ' αυτού συνεισέφερε στην ωσμωτική ισορροπία. Στην θερμική καταπόνηση ο τραυματισμός σε Ringer είναι σχεδόν σε όλα τα χρονικά σημεία περισσότερος από τον αντίστοιχο τραυματισμό σε μέσο Microcosm στο ScottA ενώ στο στέλεχος EGD-e, το ποσοστό των τραυματισμένων κυττάρων στα δείγματα αυξάνεται και στα δύο μέσα επώασης, με το μέσο Microcosm να παρουσιάζει σχεδόν σε όλες τις χρονικές στιγμές μεγαλύτερο τραυματισμό.

Η θερμοκρασία επώασης των κυττάρων *Listeria monocytogenes* αποδείχτηκε σημαντικός παράγοντας στην μελέτη του τραυματισμού σε όλες τις καταπονήσεις. Στα περιβάλλοντα λιμού, και υπό έκθεση στο απολυμαντικό BC, τα δείγματα στους 4°C παρουσίασαν μικρότερη έκταση τραυματισμού συγκριτικά με τα κύτταρα που επώαζονταν στους 20°C. Στην μελέτη του όξινου περιβάλλοντος σε Microcosm ωστόσο, στους 4°C βρέθηκε περισσότερος τραυματισμός από ότι στους 20°C. Τα αποτελέσματα αυτά διαφωνούν με τα ευρήματα των Ahamad and Marth, 1989 και των Shi et.al., 2017. Μία ερμηνεία αυτών των αποτελεσμάτων ίσως περιλαμβάνει τον μηχανισμό απόκρισης σε χαμηλές θερμοκρασίες, χάρη στον οποίο τα βακτήρια που βρίσκονταν σε συνθήκες λιμού και σε λιμό σε συνδυασμό με ωσμωτική καταπόνηση, ανταπεξήλθαν σε χαμηλότερη θερμοκρασία. Οι Pittman et.al., 2014 για παράδειγμα σημειώνουν ότι έκθεση σε 4°C προστάτευσε τα βακτήρια έναντι ωσμωτικής καταπόνησης συγκριτικά με τους 37°C.

Τα δύο στελέχη που μελετήθηκαν εμφάνισαν κατά περιπτώσεις σαφείς διαφοροποιήσεις στον τραυματισμό τους. Ιδιαίτερα στο περιβάλλον λιμού με προσθήκη 7%NaCl, το στέλεχος EGD-e τραυματίστηκε σε μεγαλύτερο βαθμό από το ScottA. Στην όξινη καταπόνηση η διαφοροποίηση των στελεχών παρατηρείται σε διαφορετικές θερμοκρασίες, αντίθετα οι Ahamad and Marth, 1989 δεν βρήκαν διαφοροποίηση μεταξύ των δύο στελεχών που μελέτησαν. Στο BC στα διαφορετικά μέσα και θερμοκρασίες υπήρχε διαφοροποίηση, γεγονός που συμφωνεί με τους Sallam and Donnelly, 1992 αν και τα προς μελέτη στελέχη είναι διαφορετικά. Θεωρείται ότι και οι δύο παράγοντες, μέσο διάλυσης και θερμοκρασία επώασης συνεισφέρουν στην διαφορετική συμπεριφορά των στελεχών ανά περίπτωση. Η μεταβλητότητα των στελεχών αναφορικά με τον τραυματισμό υπό την ίδια καταπόνηση είναι ένα φαινόμενο το οποίο πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη από την βιομηχανία τροφίμων, ειδικότερα όταν σχεδιάζονται στρατηγικές απολύμανσης των χώρων επεξεργασίας τροφίμων. Αυτό συμβαίνει επειδή τα εμμένοντα κύτταρα (persistent cells) συχνά ανήκουν στο ίδιο στέλεχος το οποίο επανεμφανίζεται (Carpentier and Cerf, 2011, Ferreira et.al., 2014, Møretro et.al., 2016). Έτσι ανά περίπτωση είναι φρόνιμο να επιλεχθούν απολυμαντικά που καταπολεμούν αποτελεσματικά τα στελέχη που έχουν ταυτοποιηθεί στο χώρο, δηλαδή θανατώνουν, δεν τραυματίζουν τα κύτταρα.

Κάθε καταπόνηση ανάλογα με τον τρόπο που δρα στα κύτταρα προκάλεσε περισσότερο ή λιγότερο ποσοστό τραυματισμού σε δεδομένη συνθήκη. Γίνεται σαφές ότι η βακτηριοστατική δράση διαφορετικών καταπονήσεων που επιφέρει παρόμοια μείωση του πληθυσμού, δημιουργεί διαφορετικού μεγέθους τραυματισμένους υποπληθυσμούς. Το αντίστροφο συμπέρασμα αληθεύει επίσης, δηλαδή υποπληθυσμοί τραυματισμένων κυττάρων ίσου μεγέθους δεν αντιστοιχούν απαραίτητα σε γενικούς πληθυσμούς ίσου μεγέθους.

Στις καταπονήσεις που μελετήθηκαν δεν βρέθηκε συσχετισμός μεταξύ της μείωσης του πληθυσμού και του τραυματισμού. Σε ορισμένες περιπτώσεις το μέγεθος του πληθυσμού παρέμενε σταθερό ενώ ο τραυματισμός μεταβάλλονταν, σε άλλες ο πληθυσμός και ο τραυματισμός άλλαζαν με την πάροδο του χρόνου. Σε όλες τις καταπονήσεις και συνθήκες παρατηρήθηκε σε ορισμένα δείγματα τάση για αύξηση του τραυματισμού ανάλογα με τον χρόνο, φαινόμενο που σημειώνουν και οι Miller *et.al.*, 2010. Αυτό μπορεί να αποδοθεί σε αυξημένο τραυματισμό ή θανάτωση υγίων κυττάρων με την πάροδο του χρόνου, έτσι το ποσοστό του τραυματισμού αυξάνεται. Υπήρχαν επίσης συνθήκες όπου τραυματισμός αυξομειώνεται, κάτι τέτοιο ίσως υποδηλώνει αυξημένη θανάτωση των τραυματισμένων κυττάρων και/ή ταυτόχρονα μειωμένο τραυματισμό υγίων κυττάρων.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε μία απλή μέθοδος για την εκτίμηση του φαινομένου του υποθανάτιου τραυματισμού σε συγκεκριμένη ένταση καταπονήσεων που σχετίζονται με περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων. Οι πειραματικές συνθήκες περιλαμβάνουν δύο μέσα τα οποία δημιουργούν απόλυτο λιμό, προσομοιάζοντας συνθήκες απουσίας θρεπτικών στοιχείων, που συχνά αντιμετωπίζει ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων, δύο θερμοκρασίες ενδιαφέροντος για την βιομηχανία τροφίμων και για δύο στελέχη. Η μελέτη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* υπό συνθήκες έλλειψης θρεπτικών στα μέσα Ringer και Microcosm Water είναι συνηθής, ωστόσο αυτά τα μέσα δεν έχουν χρησιμοποιηθεί από όσο γνωρίζουμε για την μελέτη της επίδρασης άλλων καταπονήσεων στην φυσιολογία του μικροοργανισμού. Τα αποτελέσματα της εργασίας δίνουν πληροφορίες για την θανάτωση και τον τραυματισμό των κυττάρων του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε συνθήκες που απαντώνται συχνά σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων. Τα δεδομένα ίσως συμβάλουν στην καλύτερη κατανόηση και εκτίμηση του φαινομένου του υποθανάτιου τραυματισμού και δύναται για παράδειγμα να χρησιμοποιηθούν για την βελτιστοποίηση συνθηκών απολύμανσης σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων. Μελλοντικά η εργασία δύναται να συνεχιστεί προς ποικίλες κατευθύνσεις, επιχειρώντας να ασχοληθεί με διαφορετικά ερωτήματα. Μία προσέγγιση περιλαμβάνει τον συνδυασμό της μεθόδου επιλεκτικών και μη επιλεκτικών υποστρωμάτων με άλλες, όπως κυτταρομετρία ροής και μικροσκοπία και τελική σύγκριση των ίδιων των μεθόδων και του τραυματισμού υπό διαφορετικές καταπονήσεις. Ενδιαφέρον θα είχε και η χρήση μοριακών τεχνικών με σκοπό την μελέτη έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση στην καταπόνηση ταυτόχρονα με την μελέτη του υποθανάτιου τραυματισμού. Σαφώς μπορεί να πραγματοποιηθεί επανάληψη πειραμάτων με περισσότερα επιλεκτικά μέσα, και σύγκριση της εκτίμησης του υποθανάτιου τραυματισμού για κάθε μέσο και καταπόνηση. Από άποψη καταπόνησης, θα είχε ενδιαφέρον η μελέτη του υποθανάτιου τραυματισμού που δημιουργείται από απολυμαντικά σε κλινές συγκεντρώσεων, και οξέων σε κλινές pH. Επιπλέον, είναι ενδιαφέρουσα η επέκταση της μελέτης του υποθανάτιου τραυματισμού σε άλλα απολυμαντικά και οξέα, για παράδειγμα στο απολυμαντικό PAA (peracetic acid) και σε ακετικό οξύ, τα οποία είναι επίσης διαδεδομένα στην βιομηχανία τροφίμων. Είναι εφικτή η μελέτη διαφοροποίησης στελεχών (strain variation), κάτι που φέρει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την βιομηχανία τροφίμων στην περίπτωση απολυμαντικών. Ο υποθανάτιος τραυματισμός θα μπορούσε να εκτιμηθεί όταν στα κύτταρα ασκείται παραπάνω από μία καταπόνηση, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις που έχει βρεθεί διασταυρούμενη προστασία.

Διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης και μεγέθη εμβολίων δύναται να παρουσιάσουν διαφορές αναφορικά με την θανάτωση και τον υποθανάτιο τραυματισμό στις συνθήκες που μελετώνται στην παρούσα εργασία. Τέλος, ίσως είναι εφικτό να οργανωθεί μία πειραματική μεθοδολογία με σκοπό την μελέτη των μεγεθών των υποπληθυσμών που προκύπτουν υπό καταπόνηση και πιθανού συσχετισμού τους με στρατηγικές συμπεριφοράς των πληθυσμών υπό καταπόνηση.

Εν κατακλείδι, ο υποθανάτιος τραυματισμός αποτελεί έναν αναδυόμενο κίνδυνο για την βιομηχανία τροφίμων όχι μόνο επειδή το μικροβιακό φορτίο σε ένα τρόφιμο δύναται να υποτιμηθεί, αλλά και επειδή τα τραυματισμένα κύτταρα διατηρούν ή και αυξάνουν την λοιμογόνο δράση τους. Η παρούσα εργασία εντάσσεται και ίσως συμβάλλει στη γενικότερη προσπάθεια της επιστήμης τροφίμων αρχικά να εκτιμήσει και στην συνέχεια να αντιμετωπίσει αυτόν τον κίνδυνο.

5. Βιβλιογραφία

Aase B, Sundheim G, Langsrud S, Rørvik LM (2000) Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 62: 57-63. doi:10.1016/S0168-1605(00)00357-3. PubMed: 11139022.

Ahamad, Normah & H. Marth, Elmer. (1989). Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21, and 35°C in Tryptose Broth Acidified with Acetic, Citric, or Lactic Acid. *J. Food Prot.* 52. 688-695. 10.4315/0362-028X-52.10.688.

Allerberger, F., & Wagner, M. (2010). Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16(1), 16–23

Alvarez-Ordóñez, Avelino & Prieto, M & Bernardo, Ana & Hill, Colin & López, Mercedes. (2012). The Acid Tolerance Response of *Salmonella* spp.: An adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host. *Food Research International - FOOD RES INT.* 45. 10.1016/j.foodres.2011.04.002.

Amor, K.B., Breeuwer, P., Verbaarschot, P., Rombouts, F.M., Akkermans, A.D.L., De Vos, W.M., Abee, T., 2002. Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead *Bifidobacterium* cells during bile salt stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5209–5216.

Anang D.M, G. Rusul, Jamilah Bakar, Foo H. Ling, Effects of lactic acid and lauricidin on the survival of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in chicken breast stored at 4°C, *Food Control*, Volume 18, Issue 8, 2007

Angelidis, A.S., Smith, G.M., 2003. Role of the glycine betaine and carnitine transporters in adaptation of *Listeria monocytogenes* to chill stress in defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (12), 7492–7498.

Ars`ene F, Tomoyasu T, Bukau B. The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* 55 (2000) 3–9

Bécavin C, et al., (2014) Comparison of widely used *Listeria monocytogenes* strains EGD, 10403S, and EGD-e highlights genomic variations underlying differences in pathogenicity. *MBio* 5:e00969-14

Begley Maire, Hill Colin (2015) Annual review of food science and technology. Stress Adaptation in Foodborne Pathogens 610.1146/annurev-food-030713-092350

Bergholz, Teresa M. Bowen, Barbara Bergholz, T. M., Bowen, B., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2012). *Listeria monocytogenes* shows temperature-dependent and -independent responses to salt stress, including responses that induce cross-protection against other stresses. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 2602–2612.

- Bereksi, N., Gavini, F., Benezech, T., and Faille, C. (2002) Growth, morphology and surface properties of *Listeria monocytogenes* Scott A and LO28 under saline and acid environments. *J. Appl. Microbiol.* 92, 556-565.
- Besnard V, Federighi M, Cappelier JM. 2000. Evidence of viable but non-culturable state in *Listeria monocytogenes* by direct viable count and CTC-DAPI double staining. *Food Microbiol.* 17:697–704.
- Besse, N. G., Brissonnet, F. D., Lafarge, V., & Leclerc, V. (2000). Effect of various environmental parameters on the recovery of sublethally salt-damaged and acid-damaged *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 89(6), 944–950.
- Beuchat, L. R., Brackett, R. E., Hao, D. Y.-Y. and Conner, D. E. (1986) Growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in cabbage and cabbage juice. *Can. J. Microbiol.* 32, 791-795.
- Buchanan, R. L., M. H. Golden, R. C. Whiting, J. G. Philips, and J. L. Smith. 1994. Non-thermal inactivation models for *Listeria monocytogenes*. *J. Food Sci.* 59:182–188.
- Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 75,1–13.
- Busch, S.V. and Donnelly, C.W. (1992) Development of a repair- enrichment broth for resuscitation of heat-injured *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 14–20
- Busta, F.F., 1976. Practical implications of injured microorganisms in food. *J. Milk Food Technol.* 39, 138–145
- Capozzi V, D Fiocco, ML Amodio, A Gallone, G Spano – Bacterial stressors in minimally processed food. *International journal of molecular sciences*, 2009 *International journal of molecular sciences* 10 (7), 3076-3105
- Carpentier, B., Cerf, O., 2011. Review - persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 1–8.
- Casey A, Fox EM, Schmitz-Esser S, Coffey A, McAuliffe O, Jordan K. 2014. Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* exposed to biocide stress reveals a multi-system response involving cell wall synthesis, sugar uptake, and motility. *Front Microbiol* 5:1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00068>.
- Chung, H. , Bang, W. and Drake, M. (2006), *Stress Response of Escherichia coli*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5: 52-64. doi:10.1111/j.1541-4337.2006.00002.x
- Colburn, K. G., Kaysner, C. A., Abeyta, C. Jr., and Wekell, M. M. (1990). *Listeria* species in a California coast estuarine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2007–2011.

- Cole, M. B., Jones, M. V., and Holyoak, C. (1990). The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 69, 63–72. doi: 10.1111/j.1365-2672.1990.tb02912.x
- Cossart, P. Illuminating the landscape of host– pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108, 19484–19491 (2011).
- Cossart, P. & Helenius, A. Endocytosis of viruses and bacteria. *Cold Spring Harbor Persp. Biol.* 6, a016972 (2014).
- Cotter PD, Ryan S, Gahan CGM, Hill C. 2005. Presence of GadD1 glutamate decarboxylase in selected *Listeria monocytogenes* strains is associated with an ability to grow at low pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2832–39
- de Noordhout, C. M. et al. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 14, 1073–1082 (2014).
- Dickson, J. S., and J. F. Frank. 1993. Bacterial starvation stress and contamination of beef. *Food Microbiol.* 10:215–222.
- Doyle P. Michael, Beuchat R. Larry *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, Third Edition(2007) Center for Food Safety, The University of Georgia, Griffin, GA 30223-1797
- Elhanafi D, Dutta V, Kathariou S (2010) Genetic characterization of plasmid-associated benzalkonium chloride resistance determinants in a *Listeria monocytogenes* strain from the 1998-1999 outbreak. *Appl Environ Microbiol* 76: 8231-8238. doi:10.1128/AEM.02056-10. PubMed: 20971860.
- Espina, L., García-Gonzalo, D., & Pagán, R. (2016). Detection of Thermal Sublethal Injury in *Escherichia coli* via the Selective Medium Plating Technique: Mechanisms and Improvements. *Frontiers in Microbiology*, 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01376
- Farber, J. M., and P. I. Peterkin. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55:476–511.
- Fazlara, Ali and Maryam Ekhtelat. “The Disinfectant Effects of Benzalkonium Chloride on Some Important Foodborne Pathogens.” (2013).
- Fenlon, D. R., Wilson, J., and Donachie, W. (1996). The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 641–650. doi: 10.1111/j.1365-2672. 1996.tb01966.x
- Fenlon, D. R. 1999. *Listeria monocytogenes* in the natural environment, p. 21–37. In E. T. Ryser and E. H. Marth (ed.), *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Marcel Dekker, New York, N.Y.
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., Stasiewicz, M.J., 2014. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: Epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *J. Food Prot.* 77, 150–170.

- Fleming, D. W., et al. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N. Engl. J. Med.* 312:404–407.
- Fraser, K. R., Harvie, D., Coote, P. J., and O’Byrne, C. P. (2000). Identification and characterization of an ATP binding cassette L-carnitine transporter in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4696–4704. doi: 10.1128/AEM.66. 11.4696-4704.2000
- Garner, M. R., James, K. E., Callahan, M. C., Wiedmann, M., and Boor, K. J. (2006) Exposure to salt and organic acids increases the ability of *Listeria monocytogenes* to invade Caco-2 cells but decreases its ability to survive gastric stress. *Appl. Environ. Microb.* 72, 5384-5395.
- Garrec, N., Picard-Bonnaud, F., and Pourcher, A. M. (2003). Occurrence of *Listeria* sp. and *L. monocytogenes* in sewage sludge used for land application: effect of dewatering, liming and storage in tank on survival of *Listeria* species. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35, 275–283. doi: 10.1016/S0928-8244(02) 00443-1
- Gaul, L. K., Farag, N. H., Shim, T., Kingsley, M. A., Silk, B. J., & Hyytia-Trees, E. (2013). Hospital-acquired listeriosis outbreak caused by contaminated diced Celery, Texas, 2010. *Clinical Infectious Diseases*, 56,20e26. [http://dx.doi.org/ 10.1093/cid/cis817](http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis817).
- Golden David A., Larry R. Beuchat and Robed E. Brackett. Inactivation and injury of *Listeria monocytogenes* as affected by heating and freezing. *Food Microbiology*, 1988, 5, 17-23
- González-Tejedor, G.A., Garre, A., Esnoz, A., Artés-Hernández, F., Fernández, P.S., Effect of storage conditions in the response of *Listeria monocytogenes* in a fresh purple vegetable smoothie compared with an acidified TSB medium, *Food Microbiology* (2017), doi: 10.1016/j.fm.2017.11.005.
- Gray, M. J., Freitag, N. E., & Boor, K. J. (2006). How the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* mediates the switch from environmental Dr. Jekyll to pathogenic Mr. Hyde. *Infection and Immunity*, 74, 2505e2512.
- Guevara, L., Antolinos, V., Palop, A., & Periago, P. M. (2015). Impact of Moderate Heat, Carvacrol, and Thymol Treatments on the Viability, Injury, and Stress Response of *Listeria monocytogenes*. *BioMed Research International*, 2015, 1–10. doi:10.1155/2015/548930
- <http://www.who.int/csr/don/28-march-2018-listeriosis-south-africa/en/>
- Hurst, A. 1977. Bacterial injury: a review. *Can. J. Microbiol.* 23: 935–944.
- Hurst, A. 1984. Revival of vegetative bacteria after sublethal heating, p. 77–103. In M. H. E. Andrew and A. D. Russell (ed.), *The revival of injured microbes*. Academic Press, London.
- Isom, L. L., Khambatta, Z. S., Moluf, J. L., Akers, D. F., and Martin, S. E. (1995) Filament formation in *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 58, 1031-1033.
- Ita, P. S., and R. W. Hutkins. 1991. Intracellular pH and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in tryptic soy broth containing acetic, lactic, citric, and hydrochloric acids. *J. Food Prot.* 54:15–19.

Jarvis NA, O'Bryan CA, Ricke SC, Johnson MG, Crandall PG. 2016. A review of minimal and defined media for growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 66:256–269.

Jarvis A. Nathan, Corliss A. O'Bryan, Elizabeth M. Martin, Steven C. Ricke, Michael G. Johnson, and Philip G. Crandall (2017) Further Evidence of How Unbuffered Starvation at 4°C Influences *Listeria monocytogenes* EGD-e, HCC23, F2365, and Scott A. *Journal of Food Protection*: October 2017, Vol. 80, No. 10, pp. 1749-1759.

Jemmi, T., and Keusch, A. (1994). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in freshwater fish farms and fish-smoking plants. *Food Microbiol.* 11, 309–316. doi: 10.1006/fmic.1994.1035

Kethireddy, Vidya & Oey, Indrawati & Jowett, Tim & Bremer, Phil. (2016). Critical analysis of the Minimum Non Inhibitory Concentration (MNIC) method in quantifying sub-lethal injury in *Saccharomyces cerevisiae* cells exposed to either thermal or pulsed electric field treatments. *International Journal of Food Microbiology*. 233. 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.008.

Lado B.H. and A. E. Yousef, "Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors," in *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, E.T. Ryser and E.H. March, Eds., pp.157–213, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 2007.

Laksanalamai P, Joseph LA, Silk BJ, Burall LS, L. Tarr C, Gerner-Smidt P, et al. (2012) Genomic Characterization of *Listeria monocytogenes* Strains Involved in a Multistate Listeriosis Outbreak Associated with Cantaloupe in US. *PLoS ONE* 7(7): e42448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042448>

Lambrechts, A., Gevaert, K., Cossart, P., Vandekerckhove, J. & Van Troys, M. *Listeria comet tails: the actin-based motility machinery at work.* *Trends Cell Biol.* 18, 220–227 (2008).

Leistner L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int. J. Food Microbiol.* 55:181–86

Levandowsky, M. *Microbial Ecology of Foods. Volume 1: Factors Affecting Life and Death of Microorganisms.* The International Commission on Microbiological Specifications for Foods *The Quarterly Review of Biology*, volume 56, number 2, pages 204–204, (1981) doi:10.1086/412232,

Lunden, J., Autio, T., Markkula, A., Hellstrom, S., & Korkeala, H. (2003). Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*, 82(3), 265e272.

Lyautey, E., Lapen, D. R., Wilkes, G., McCleary, K., Pagotto, F., Tyler, K., et al. (2007). Distribution and characteristics of *Listeria monocytogenes* isolates from surface waters of the South Nation River watershed, Ontario, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5401–5410. doi: 10.1128/AEM.00354-07

Mackey, B. M. 1984. Lethal and sublethal effects of refrigeration, freezing and freeze-drying on micro-organisms, p. 45–75. In M. H. E. Andrew and A. D. Russell (ed.), *The revival of injured microbes.* Academic Press, London.

- Mackey, B. M. 2000. Injured bacteria, p. 315–341. In A. M. Lund, T. C. Baird-Parker, and G. W. Gould (ed.), *The microbiological safety and quality of food*. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, MD.
- Maclean, M., Macgregor, S. J., Anderson, J. G., and Woolsey, G. (2009). Inactivation
- Malley TJ, Butts J, Wiedmann M. 2015. Seek and destroy process: *Listeria monocytogenes* process controls in the ready-to-eat meat and poultry industry. *J. Food Prot.* 78:436–445.
- Man˜as P and R. Paga˜n Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology* 2005, 98, 1387–1399
- McDonnell, G., and A. D. Russell. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:147–179.
- McLaughlin, H. P., Casey, P. G., Cotter, J., Gahan, C. G., and Hill, C. (2011). Factors affecting survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in soil samples. *Arch. Microbiol.* 193, 775–785. doi: 10.1007/s00203-011-0716-7
- Meyer, B. (2006). Does microbial resistance to biocides create a hazard to food hygiene? *Int. J. Food Microbiol.* 112, 275–279. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.012
- Miller, F.A., Brandao, T.R.S., Teixeira, P., Silva, C.L.M., 2006. Recovery of heat-injured *Listeria innocua*. *Int. J. Food Microbiol.* 112, 261–265.
- Miller, F. A., Ramos, B., Brand˜ao, T. R. S., Teixeira, P., & Silva, C. L. M. (2010). Comparison of recovery methods for the enumeration of injured *Listeria innocua* cells under isothermal and non-isothermal treatments. *Food Microbiology*, 27(8), 1112–1120. doi:10.1016/j.fm.2010.07.018
- Mˆretrˆ, Trond & C.T. Schirmer, Bjˆrn & Heir, Even & Fagerlund, Annette & Hjemli, Pernille & Langsrud, Solveig. (2016). Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may enhance growth of *Listeria monocytogenes* in the food industry. *International Journal of Food Microbiology*. 241. 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.025.
- Muller, A., Rychli, K., Muhterem-Uyar, M., Zaiser, A., Stessl, B., Guinane, C. M., et al. (2013). Tn6188—a novel transposon in *Listeria monocytogenes* responsible for tolerance to benzalkonium chloride. *PLoS ONE* 8:e76835. doi: 10.1371/journal.pone.0076835
- Murray EGD, Webb RA, Swann MBR. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus: *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *J Pathol Bacteriol* 1926;29: 407–39.
- Mustapha, A., Liewen, B., 1989. Destruction of *Listeria monocytogenes* by sodium hypochlorite and quaternary ammonium sanitizers. *J. Food Protect.* 52, 306–311.
- Nesbakken, T., Kapperud, G., Caugant, D.A., 1996. Pathways of

NicAogáin K and O'Byrne CP (2016) The Role of Stress and Stress Adaptations in Determining the Fate of the Bacterial Pathogen *Listeria monocytogenes* in the Food Chain. *Front. Microbiol.* 7:1865. doi: 10.3389/fmicb.2016.01865

Oh, D. H., and D. L. Marshall. 1993. Antimicrobial activity of ethanol, glycerol monolaurate or lactic acid against *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 20:239–246.

Oliver HF, Orsi RH, Wiedmann M, Boor KJ. 2010. *Listeria monocytogenes* σ B has a small core regulon and a conserved role in virulence but makes differential contributions to stress tolerance across a diverse collection of strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:4216–32

Olszewska, M. A., Zhao, T., & Doyle, M. P. (2016). Inactivation and induction of sublethal injury of *Listeria monocytogenes* in biofilm treated with various sanitizers. *Food Control*, 70, 371–379. doi:10.1016/j.foodcont.2016.06.015

Pirie, 1940, 383AL p. 1235-1245. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Pittman Joseph R., Buntyn, Joe O., Posadas Gabriel, Nanduri Bindu, Pendarvis Ken, Donaldson Janet R. (2014) Proteomic analysis of cross protection provided between cold and osmotic stress in *Listeria monocytogenes* *Journal of Proteome Research* dx.doi.org/10.1021/pr401004a | *J. Proteome Res.* 2014, 13, 1896–1904

Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I., Nir-Paz, R. & Herskovits, A. A. Prophage excision activates *Listeria* competence genes that promote phagosomal escape and virulence. *Cell* 150, 792–802 (2012).

Radoshevich L, P Cossart . *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis (2018) *Nature Reviews Microbiology* 16 (1), 32

Rawson, A., Patras, A., Tiwari, B.K., Noci, F., Koutchma, T., Brunton, N., 2011. Effect of thermal and nonthermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Res. Int.* 44, 1875–1887.

Rocourt J, Cossart P. *Listeria monocytogenes*. In: *Food Microbiology - Fundamentals and Frontiers*. (M.P. Doyle, L.R. Beuchat and T.J. Montville, Eds.), American Society for Microbiology (Washington DC, USA) 1997; 337-52.

Russell N. 1990. Cold adaptation of microorganisms. *Phil Trans R Soc (Lond)* 436:595–611.

SALLAM, S. S., & DONNELLY, C. W. (1992). Destruction, Injury, and Repair of *Listeria* Species Exposed to Sanitizing Compounds. *Journal of Food Protection*, 55(10), 771–776. doi:10.4315/0362-028x-55.10.771

Schlech. W. F., P. M. Lavigne. R. A. Bortolussi. A. C. Allen. E. V. Haldane. A. J. Wort, A. W. Hightower. S. E. Johnson, S. H. King, E. S. Nicholls. and C. V. Broome. 1983. Epidemic *Listeriosis*-Evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.* 308:203-206.

Shahamat, M., Seaman, A., & Woodbine, M. (1980). Survival of *Listeria monocytogenes* in High Salt Concentrations. *Zentralblatt Für Bakteriologie. 1. Abt. Originale A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten Und Parasitologie*, 246(4), 506–511. doi:10.1016/s0172-5599(80)80085-x

Shi Hui, Chen Zhuozhu, Chen Dong, Kan Jianquan(2017) *Food Control*. Sublethal injury and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 and K-12 after exposure to lactic acid. 82 10.1016/j.foodcont.2017.06.017

Sibanda, Thulani & Buys, Elna. (2017). Resuscitation and growth kinetics of sub-lethally injured *Listeria monocytogenes* strains following fluorescence activated cell sorting (FACS). *Food Research International*. 100. 10.1016/j.foodres.2017.08.020.

Sleator, R. D., Gahan, C. G. M., and Hill, C. (2003). A postgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1–9. doi: 10.1128/AEM.69.1.1-9.2003

Smith, J.L., Archer, D.L., 1988. Heat-induced injury in *Listeria monocytogenes*. *J. Ind. Microbiol.* 3, 105–110.

Smith, J. J., Howington, J. P., and Mcfeters, G. A. (1994). Survival, physiological- response, and recovery of Enteric bacteria exposed to a Polar marine- environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2977–2984.

Smolka, L.R., Nelson, F.E., Kelley, L.M., 1974. Interaction of pH and NaCl on enumeration of heat-stressed *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 27, 443–447.

Strawn, L. K., Fortes, E. D., Bihn, E. A., Nightingale, K. K., Grohn, Y. T., Worobo, R. W., et al. (2013). Landscape and meteorological factors affecting prevalence of three food-borne pathogens in fruit and vegetable farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 588–600. doi: 10.1128/AEM.02491-12

Tamburro, Manuela & Ripabelli, Giancarlo & Vitullo, Monia & James Dallman, Timothy & Pontello, Mirella & Amar, Corinne & Lucia Sammarco, Michela. (2015). Gene expression in *Listeria monocytogenes* exposed to sublethal concentration of benzalkonium chloride. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 40. 10.1016/j.cimid.2015.03.004.

The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015 European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, 10.2903/j.efsa.2016.4634 EFSA Journal 14121831-4732 <http://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4634> 2016Wiley Online Library

Tuncan, E.U., 1993. Effect of cold temperature on germicidal efficacy of quaternary ammonium compound, iodophor, and chlorine on *Listeria*. *J. Food Protect.* 56, 1029–1033.

Van der Veen S, Moezelaar R, Abee T, Wells-Bennik MJH. 2008. The growth limits of a large number of *Listeria monocytogenes* strains at combinations of stresses show serotype- and niche-specific traits. *J. Appl. Microbiol.* 105:1246–58

Wang Xiang, Devlieghere Frank, Geeraerd Annemie, Uyttendaele Mieke, Thermal inactivation and sublethal injury kinetics of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in broth versus agar surface. *International Journal of Food Microbiology* 243 (2017) 70–77

Welshimer, H. J., and Donker-Voet, J. (1971). *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl. Microbiol.* 21, 516–519.

Weis, J., and Seeliger, H. P. (1975). Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl. - Microbiol.* 30, 29–32.

Wesche, A.M., Gurtler, J.B., Marks, B.P., Ryser, E.T., 2009. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *J. Food Prot.* 72, 1121–1138.

Wu, V.C.H., 2008. A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiol.* 25, 735–744.

Xayarath, B., Alonzo, F. 3rd & Freitag, N. E. Identification of a peptide-pheromone that enhances *Listeria monocytogenes* escape from host cell vacuoles. *PLoS Pathog.* 11, e1004707 (2015).

Yousef AE, Courtney PD. 2003. Basics of stress adaptation and implications in new-generation foods. In *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*, ed. AE Yousef, VK Juneja. Boca Raton, FL: CRC

Υπόμνημα

Lactic Acid pH 3.0	ScottA				EGD-E			
	Ringer		Microcosm		Ringer		Microcosm	
TIME	20oC	4oC	20oC	4oC	20oC	4oC	20oC	4oC
0h	-	-	-	-	-	*	-	-
4h	-	**	-	-	-	***	-	-
8h	-	***	**	*	*	-	-	-
24h	-	*	-	****	-	-	-	-
30h	*	-	-	**	*	-	-	-

Πίνακας 1: Χρονικές στιγμές του πειράματος καταπόνησης σε γαλακτικό οξύ, pH 3.0 δύο στελεχών του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε δύο διαφορετικά μέσα και θερμοκρασίες. Με -, *, **, *** και **** συμβολίζεται η ύπαρξη στατιστικά σημαντικού τραυματισμού μέσα σε ένα δείγμα.

Benzalkonium Chloride 10ppm	ScottA				EGD-E			
	Ringer		Microcosm		Ringer		Microcosm	
TIME	20oC	4oC	20oC	4oC	20oC	4oC	20oC	4oC
0h	-	-	-	-	*	-	-	-
1h	-	-	-	*	-	-	-	-
2h	-	-	-	-	-	*	-	-
4h	*	-	-	-	-	-	*	-
6h	*	-	*		-	-	*	

Πίνακας 2: Χρονικές στιγμές του πειράματος καταπόνησης στο απολυμαντικό BC, 10ppm δύο στελεχών του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε δύο διαφορετικά μέσα και θερμοκρασίες. Με - και * συμβολίζεται η ύπαρξη στατιστικά σημαντικού τραυματισμού μέσα σε ένα δείγμα.

Heating 55°C	ScottA		EGD-E	
	Ringer	Microcosm	Ringer	Microcosm
0min	-	-	-	-
30min	-	-	-	-
60min	-	*	-	**
90min	-	-	*	
120 min	-	-	-	***

Πίνακας 3: Χρονικές στιγμές του πειράματος καταπόνησης σε θερμοκρασία 55°C δύο στελεχών του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε δύο διαφορετικά μέσα Με – και *, **, *** συμβολίζεται η ύπαρξη στατιστικά σημαντικού τραυματισμού μέσα σε ένα δείγμα.

STARVATIO N	ScottA				EGD-E			
	Ringer		Microcosm		Ringer		Microcosm	
TIME	20oC	4oC	20oC	4oC	20oC	4oC	20oC	4oC
1 d	-	-	-	-	-	-	*** at 4d	*
7d	-	-	* at 10d	*	-	-	*** at 10d	-
14d	-	*	-	-	-	**	-	-
21d	-	-	* at 17d	-	-	*	**	-
28d	-	-	-	-	-	-	-	-
35d	-	-		-	-	-	-	-
42d	-	-		-	*	-	-	-
49d	-	-		*	-	-	**	
56d	**	-		-	**	-		

Πίνακας 4: Χρονικές στιγμές του πειράματος καταπόνησης λιμού δύο στελεχών του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε δύο διαφορετικά μέσα και θερμοκρασίες. Με -, *, **, *** και **** συμβολίζεται η ύπαρξη στατιστικά σημαντικού τραυματισμού μέσα σε ένα δείγμα.

STARVATIO N +7%NaCl	ScottA				EGD-E			
	Ringer		Microcosm		Ringer		Microcosm	
	20oC	4oC	20oC	4oC	20oC	4oC	20oC	4oC
1 d	-	-	-	-	-	-	-	**
7d	-	-	-	-	***	-	*	***
14d	-	-	-	-	***	*	-	*
21d	-	-	-	-	***	-	**	*
28d	-	-	-	-	***	***	**	***
35d	-	-	-	-	***	*	**	***
42d	-	-	-	-	**	***	-	-
49d	-	*	-	-	-	*	-	*
56d		-	*		*	-	-	

Πίνακας 5: Χρονικές στιγμές του πειράματος καταπόνησης λιμού δύο στελεχών του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε δύο διαφορετικά μέσα και θερμοκρασίες. Με -, *, **, *** και **** συμβολίζεται η ύπαρξη στατιστικά σημαντικού τραυματισμού μέσα σε ένα δείγμα.