



Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών

Στοχαστική προσέγγιση της επίδρασης ήπιων συνθηκών
καταπόνησης στην αύξηση του παθογόνου
Listeria monocytogenes και στην κινητική θανάτωσης κατά
τη διάρκεια όξινης καταπόνησης.

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Σιδεράκου Δανάη

Επιβλέπων καθηγητής : Σκανδάμης Παναγιώτης

Αθήνα 2015

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών (Π.Μ.Σ)
«Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων & Διατροφής του
ανθρώπου»**

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Δανάη Α. Σιδεράκου

**Στοχαστική προσέγγιση της επίδρασης ήπιων
συνθηκών καταπόνησης στην αύξηση του παθογόνου
Listeria monocytogenes και στην κινητική θανάτωσης
κατά τη διάρκεια όξινης καταπόνησης.**

Επιβλέπων καθηγητής :

Σκανδάμης Παναγιώτης, (Επίκουρος καθηγητής)

Εξεταστική Επιτροπή :

Σκανδάμης Παναγιώτης, (Επίκουρος Καθηγητής)

Πανάγου Ευστάθιος, (Επίκουρος Καθηγητής)

Τσακαλίδου Ευθυμία, (Καθηγήτρια)

All the physical and chemical laws that are known to play an important part in the life of organisms are of statistical kind.

Erwin Schrödinger,
What Is Life? The Physical Aspect of the Living Cell

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	12
1.1. Ο παθογόνος μικροοργανισμός <i>Listeria monocytogenes</i>	12
1.1.1 Ιστορικά στοιχεία	12
1.1.2 Χαρακτηριστικά του <i>L. monocytogenes</i>	12
1.2. <i>Listeria monocytogenes</i> και τρόφιμα.....	13
1.2.1. Κρούσματα λιστερίωσης	13
1.2.2. Φαινόμενο διασταυρούμενης ανθεκτικότητας (Cross protection phenomenon)	15
1.3. Κλινικά χαρακτηριστικά και παθογένεια	17
1.3.1. Ο ρόλος του ρυθμιστικού παράγοντα PrfA στη λοιμωξιολογία δράση	21
1.3.2. Ο ρόλος του ρυθμιστικού παράγοντα σ^B στη λοιμωξιολογία δράση	23
1.3.3. Παθογένεια και καταπόνηση	25
1.4. Επιβίωση του <i>L. monocytogenes</i> σε συνθήκες όξινης καταπόνησης.....	27
1.4.1. Ρόλος του συστήματος αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού (glutamate decarboxylase system, GAD).....	27
1.4.2. Ρόλος του συστήματος απαμινάσης της αργινίνης (arginine deiminase, ADI)	30
1.4.3. Ρόλος του παράγοντα σ^B στην όξινη καταπόνηση	31
1.5. Επιβίωση του <i>L. monocytogenes</i> σε συνθήκες ωσμωτικής καταπόνησης	33
1.5.1. Ρόλος του παράγοντα σ^B σε συνθήκες ωσμωτικής καταπόνησης.....	35
1.6. Στοχαστικότητα	36
1.7. Υπόθεση Εργασίας	39
2. Υλικά Και Μέθοδοι.....	42
2.1 Στελέχη μικροοργανισμών	42
2.2 Προετοιμασία εμβολίου	42
2.3 Εκτίμηση παραλλακτικότητας.....	43
2.4 Εκτίμηση της παραλλακτικότητας στην ικανότητα ανάπτυξης του <i>L. monocytogenes</i> υπό την επίδραση υποθανάτιων συνδυασμών pH και NaCl.	44
2.4.1. Προετοιμασία εμβολίου και θρεπτικού υποστρώματος.....	44
2.4.2. Εκτίμηση ικανότητας ανάπτυξης.....	47
2.4.3 Εκτίμηση παραλλακτικότητας παραμέτρων ανάπτυξης	48
2.5 Εκτίμηση της επίδρασης υποθανάτιων συνδυασμών pH και NaCl στην παραλλακτικότητα της οξεοανθεκτικότητας του <i>L. monocytogenes</i>	50

2.5.1. Προετοιμασία εμβολίου και θρεπτικού υποστρώματος.....	51
2.5.2. Εκτίμηση οξεοανθεκτικότητας του <i>L. monocytogenes</i>	52
2.5.3. Εκτίμηση παραλλακτικότητας παραμέτρων θανάτωσης.....	53
2.6. Εκτίμηση της παραλλακτικότητας των σχετικών επιπέδων γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε οριακές για την ανάπτυξη συνθήκες pH και NaCl.....	55
2.6.1. Σκοπός.....	55
2.6.2 Εμβολιασμός και συνθήκες συντήρησης.....	55
2.6.3 Συλλογή βιομάζας.....	56
2.6.4 Απομόνωση ολικού RNA.....	56
2.6.5 Χειρισμός με DNAση.....	57
2.6.6 Δημιουργία cDNA.....	59
2.6.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time PCR).....	60
2.6.8 Εκτίμηση επιπέδων παραλλακτικότητας στην σχετική έκφραση των γονιδίων.....	61
2.7. Στατιστική ανάλυση.....	63
3. Αποτελέσματα.....	64
3.1 Εκτίμηση της παραλλακτικότητας στην ικανότητα ανάπτυξης του <i>Listeria monocytogenes</i> υπό την επίδραση υποθανάτιων συνδυασμών pH και NaCl.....	64
3.2. Εκτίμηση της επίδρασης ωσμωτικής και όξινης καταπόνησης στην παραλλακτικότητα της οξεοανθεκτικότητας του <i>L. monocytogenes</i> έναντι ακραίας όξινης καταπόνησης.....	81
3.3. Εκτίμηση της παραλλακτικότητας των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων <i>gad2</i> , <i>sigB</i> , <i>ropB</i> και <i>prfA</i> κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε οριακές για την ανάπτυξη συνθήκες pH και NaCl.....	89
4. Συμπεράσματα.....	95
Βιβλιογραφία.....	96

Abstract

Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen with high adaptive response potential, capable of surviving under stringent environmental conditions. In a previous study it was shown that habituation of *L. monocytogenes* across marginal for growth acid and osmotic conditions has an impact on growth, survival under low acidic conditions and transcription levels of stress- and virulence- associated genes.

The aim of this study was to evaluate the impact of biological and experimental variability during culture preparation of *Listeria monocytogenes* on the stochastic outcome of: (i) growth (ii) acid resistance and (iii) relative transcription of stress- and virulence- associated genes, such as glutamate decarboxylase system (*gad2*) sigma factor B (*sigB*) and positive regulatory factor A (*prfA*), in response to pH and NaCl combinations near and across the growth/no growth interface of the organism at 7°C.

In order to assess experimental variability, *L. monocytogenes* strain C5 (serotype 4b) inocula were prepared from: i) different colonies (B), ii) same colony and different second activation (B) and iii) same colony and same second activation (T). In addition, biological replicates (Date) corresponded to independent reproductions (n=3) of the entire experimental set up. Tryptic Soy Broth supplemented with 0.6% w/v yeast extract (TSBYE) and various combinations of NaCl (0-8 % w/v) and pH (4.8-7.2) (HCl) was inoculated with ca. 10^7 CFU/mL of *L. monocytogenes* and stored at 7°C. Growth was monitored via optical density (620 nm) in 96-well microplates for a 20-day period (n=15x3) and OD data were used to estimate growth rate and lag time (DMFit) as well as the area under the generated growth curve. Quantitative Real time PCR was used to evaluate gene transcriptional changes (24h post inoculation) (n=5x3) (Folds Change, FC), while survival under subsequent acidic conditions (TSBYE pH 2.0, HCl, 37°C, up to 35 min) was assessed using D-values determined by fitting the biphasic model without shoulder of GinaFiT freeware (n=5x3). Coefficient of variation (%) and root mean square error (RMSE) was used to quantify experimental and biological variability, as well as the variability derived from the inoculum preparation (B,C,T).

Results showed that high experimental variability regarding growth potential of the pathogen, is observed in conditions across growth boundaries (at 7°C), such as pH 5.5-6.4 and NaCl 2-8% w/v, as manifested by the highly ranged growth parameters (CV_{areas} 18.3% - 49%, $RMSE_{\text{areas}}$ 8.7-13.9, $RMSE_{\text{lag time}}$ 9.3-31.2) in contrast to low variability of bacterial response under optimum growth conditions, pH 7.2, ($RMSE_{\text{areas}}$ 5.9, $RMSE_{\text{lagtime}}$ 5.35). Habituation of the bacterium under pH 5.0-5.5 and NaCl 2% w/v resulted in high acid resistance against subsequent lethal pH, manifested by $D1_{\text{pH:2.0}}$ -values (3-21 min) and $D2_{\text{pH:2.0}}$ -values (14-36 min). Experimental variability in bacterial response under these acid adaptation inductive conditions was high (CV_{D1} 28-35%, CV_{D2} 35-60%), contrary to habituation of *L. monocytogenes* at pH 6.0-7.2 and NaCl 4-8% w/v that resulted in lower experimental variability $CV_{D2} < 35\%$ and reduced acid tolerance. Different preparation of bacterial inoculum resulted in similar variabilities, indicating that growth conditions may have greater effect on heterogeneity of bacterial response. Biological variability was close or less than experimental variability regarding all parameters tested (except area), given that the number of experimental replicates was adequate to well describe bacterial varying response. As regards gene transcription, while *sigB* was unchanged or even downregulated in all tested conditions, habituation at pH 5.2 and NaCl 2% w/v that induced acid adaptation, resulted in the upregulation of *gad2* (FC 500-1500) with experimental variability of $RMSE_{\text{foldchange}}$ 2.8, while relative transcription levels of *pfrA* ranged from 0.60 to 4.22.

These findings could contribute to the stochastic assessment of *L. monocytogenes* survival and growth responses close to the growth boundaries and pinpoint the underlying concerns in experimental approaches assessing the stress response of pathogens under growth limiting conditions.

Περίληψη

Ο *Listeria monocytogenes* αποτελεί παθογόνο μικροοργανισμό τροφιμογενούς προέλευσης, με αυξημένη ικανότητα προσαρμογής και επιβίωσης υπό αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες. Σε προηγούμενη μελέτη έχει δειχθεί ότι η παραμονή του *L. monocytogenes* σε συνθήκες ήπιας ωσμωτικής και όξινης καταπόνησης εκατέρωθεν των ορίων ανάπτυξης έχει επίδραση στην ικανότητα ανάπτυξης και επιβίωσής του σε συνθήκες ήπιας όξινης καταπόνησης και στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την αντιμετώπιση καταπονήσεων και την παθογένεια.

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η εκτίμηση της επίδρασης της βιολογικής και πειραματικής παραλλακτικότητας κατά την προετοιμασία της καλλιέργειας στη στοχαστική απόκριση του *L. monocytogenes* στην: (α) ανάπτυξη, (β) οξεοανθεκτικότητα και (γ) μεταγραφή γονιδίων σχετιζόμενων με αντιμετώπιση καταπονήσεων (*gad2*-glutamate decarboxylase 2, *sigB*-sigma B factor) και λοιμοξιογόνο δράση (*prfA*- positive regulatory factor), έναντι συνδυασμών pH και NaCl εκατέρωθεν των ορίων ανάπτυξης/μη ανάπτυξης του μικροοργανισμού στους 7°C.

Για την εκτίμηση της πειραματικής παραλλακτικότητας, εμβόλια του στέλεχους C5 (ορότυπος 4b) του *L. monocytogenes* παρασκευάστηκαν από (α) διαφορετικές αποικίες (C), (β) ίδια αποικία και διαφορετική B' ανανέωση (B) ίδια αποικία και ίδια B' ανανέωση (T), ενώ για την εκτίμηση της βιολογικής παραλλακτικότητας πραγματοποιούταν επανάληψη ολόκληρου του πειραματικού σχεδιασμού (Dates, n=3). Θρεπτικό υπόστρωμα TSB με 0.6 % w/v Yest Extract παρασκευασμένο με διαφορετικούς συνδυασμούς pH (4.8-7.2) και NaCl (0-10% w/v), εμβολιάστηκε με 10^7 log CFU/mL *L. monocytogenes* και συντηρήθηκε στους 7°C. Η παρακολούθηση της ανάπτυξης πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε τριβλία μικροτιτλοδότητησης 96-θέσεων για διάστημα 20 ημερών (n=15x3) και τα δεδομένα της οπτικής πυκνότητας που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του ρυθμού αύξησης, του χρόνου προσαρμογής και του εμβαδού υπο της καμπύλης ανάπτυξης. Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative Real time PCR)

χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της μεταβολής των επιπέδων σχετικής μεταγραφής γονιδίων, μετά από 24 ώρες έκθεση σε επιλεγμένες υποθανάτιες συνθήκες pH-NaCl ($n=5 \times 3$) (Folds Change, FC), ενώ η επιβίωση σε μετέπειτα έκθεσή σε όξινη καταπόνηση (TSBYE pH 2.0, HCl, 37°C, μέχρι 35 min) εκτιμήθηκε με τον προσδιορισμό των τιμών D-values προσαρμόζοντας τα δεδομένα σε δι-φασικά μοντέλα απενεργοποίησης (GinaFiT freeware) ($n=5 \times 3$). Για την ποσοτικοποίηση της πειραματικής και βιολογικής παραλλακτικότητας, καθώς και για την παραλλακτικότητα που προέκυψε από την προέλευση των εμβολίων (B.C.T) χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής μεταβλητότητας Coefficient of variation (%) και η ρίζα μέσου τετραγώνου σφάλματος and root mean square error (RMSE).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υψηλή πειραματική παραλλακτικότητα στην ικανότητα ανάπτυξης του παθογόνου παρατηρήθηκε σε συνθήκες κοντά στα όρια ανάπτυξης-μη ανάπτυξης του μικροοργανισμού (στους 7°C) όπως pH 5.5-6.4 και NaCl 2-8% w/v, όπως φάνηκε από τη μεγάλη διακύμανση των παραμέτρων ανάπτυξης (CV_{areas} 18.3% - 49%, $RMSE_E$ 8.7-13.9, $RMSE_{\text{lag time}}$ 9.3-31.2), ενώ, χαμηλή παραλλακτικότητα στη βακτηριακή απόκριση παρατηρήθηκε σε ευνοϊκές για την ανάπτυξη του παθογόνου συνθήκες pH 7.2 ($RMSE_{\text{areas}}$ 5.9, $RMSE_{\text{lagtime}}$ 5.35). Ο εγκλιματισμός του παθογόνου σε συνθήκες pH 5.0-5.5 και NaCl 2% w/v είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση οξεοανθεκτικότητας σε μετέπειτα ισχυρή όξινη καταπόνηση (pH 2.0) με τιμές $D1_{\text{pH:2.0-values}}$ (3-21 min) και $D2_{\text{pH:2.0-values}}$ (14-36 min). Η πειραματική παραλλακτικότητα στη βακτηριακή απόκριση στις συνθήκες που επάγουν οξεοανθεκτικότητα ήταν υψηλή (CV_{D1} 28-35%, CV_{D2} 35-60%) σε αντίθεση με αυτήν στις συνθήκες pH 6.0-7.2 και NaCl 4-8% w/v που εμφάνισαν χαμηλή πειραματική παραλλακτικότητα $CV_{D2} < 35\%$ και χαμηλή οξεοανθεκτικότητα. Οι διαφορετικοί τρόποι προετοιμασίας του εμβολίου είχαν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση παρόμοιων επιπέδων παραλλακτικότητας γεγονός που υποδεικνύει ότι οι συνθήκες ανάπτυξης μπορεί να έχουν μεγαλύτερη επίδραση στην στοχαστική απόκριση του μικροοργανισμού. Τα επίπεδα βιολογικής παραλλακτικότητας ήταν χαμηλότερα ή κοντά σε αυτά της πειραματικής παραλλακτικότητας σε όλες τις παραμέτρους ανάπτυξης που μελετήθηκαν (εκτός από το εμβαδόν υπό της καμπύλης ανάπτυξης) κάτι που υποδεικνύει ότι ο μεγάλος αριθμός των πειραματικών επαναλήψεων επαρκεί για την περιγραφή της στοχαστικής απόκρισής του μικροοργανισμού. Όσον

αφορά στη μεταγραφή των γονιδίων, ενώ τα επίπεδα έκφρασης του *sigB* παρέμειναν σταθερά ή μειώνονταν σε όλες τις συνθήκες που μελετήθηκαν, η παραμονή σε pH 5.2 και NaCl 2% w/v που επάγει οξεοανθεκτικότητα είχε ως αποτέλεσμα τη θετική μεταβολή των επιπέδων έκφρασης του *gad2* (FC 500-1500) με υψηλή πειραματική παραλλακτικότητα $RMSE_{\text{foldschange}}$ 2.8, ενώ τα επίπεδα σχετικής μεταβολής του *prfA* κυμαίνονταν από 0.60 έως 4.22

Τα παραπάνω δεδομένα δύνανται να συνεισφέρουν στη στοχαστική περιγραφή της επιβίωσης και ανάπτυξης του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε συνθήκες πλησίον των ορίων ανάπτυξης/ μη ανάπτυξης του μικροοργανισμού καθώς και να αναδείξουν την υποβόσκουσα επικινδυνότητα στις πειραματικές προσεγγίσεις της απόκρισης του παθογόνου υπό οριακές για την ανάπτυξη συνθήκες.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου και Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου κ. Παναγιώτη Σκανδάμη για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου αναθέτοντας μου την εκπόνηση αυτής της ερευνητικής εργασίας καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές και τη καθοδήγηση του σε όλη τη διάρκεια της. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω θερμά την Υποψήφια Διδάκτορα Μακαρίτη Ιφιγένεια, του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την προθυμία της και την ανεκτίμητη συνεισφορά της στην εκπόνηση αυτής της μελέτης. Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την συνεργασία και την προθυμία τους να προσφέρουν τις γνώσεις και την εμπειρία τους στην εν λόγω εργασία. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής τον Καθηγητή κ. Ευστάθιο Πανάγου και την Καθηγήτρια κα. Τσακαλίδου Έυθυμία.

1. Εισαγωγή

1.1. Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes*

1.1.1 Ιστορικά στοιχεία

Το βακτήριο *L. monocytogenes* και η ασθένεια λιστερίωση αναγνωρίστηκε πρώτη φορά σε εργαστηριακά ζώα το 1924 στο Cambridge (Murray et al., 1926). Οι πρώτες τεκμηριωμένες απομονώσεις του βακτηρίου έγιναν το 1929 από τον Gill από πρόβατα και από τον Nyfeldt από ανθρώπους. Από τότε σημειώνονταν κρούσματα λιστερίωσης σποραδικά, συχνότερα από εργαζόμενους που έρχονταν σε επαφή με μολυσμένα από *L. monocytogenes* ζώα (Farber & Losos, 1988). Τα μαζικά κρούσματα λιστερίωσης που παρατηρήθηκαν όμως το 1980 σε αρκετές χώρες (McLauchlin, 1993) έστρεψε περισσότερο το ενδιαφέρον στη μελέτη αυτού του μικροοργανισμού (Farber and Peterkin, 1991).

1.1.2 Χαρακτηριστικά του *L. monocytogenes*

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είναι θετικός κατά Gram, προαιρετικά αναερόβιος, μη σπορογόνος ραβδόμορφος μικροοργανισμός με μέγιστη κινητικότητα σε θερμοκρασία 20-25 °C. Είναι ψυχρότροφος μικροοργανισμός και αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες μεταξύ 1-45 °C με ιδανικό εύρος ανάπτυξης μεταξύ 30-37 °C. (Reading, 1998). Έχει ικανότητα ανάπτυξης σε υψηλές συγκεντρώσεις NaCl, 2M (~12% w/v) και μπορεί να επιβιώσει παρουσία 3M (18% w/v) NaCl (Cole et al., 1990). Αναπτύσσεται σε μεγάλο εύρος pH (4.7-9.2) (Goebel, 2001) και παρουσιάζει προσαρμοστική συμπεριφορά σε ήπιο όξινο περιβάλλον (acid tolerance response, ATR) που του προσδίδει προστασία σε μετέπειτα έντονη όξινη καταπόνηση (pH 2.5) (Davis et al., 1996, O' Driscoll et al., 1997, O'Byrne & Karatzas, 2008).

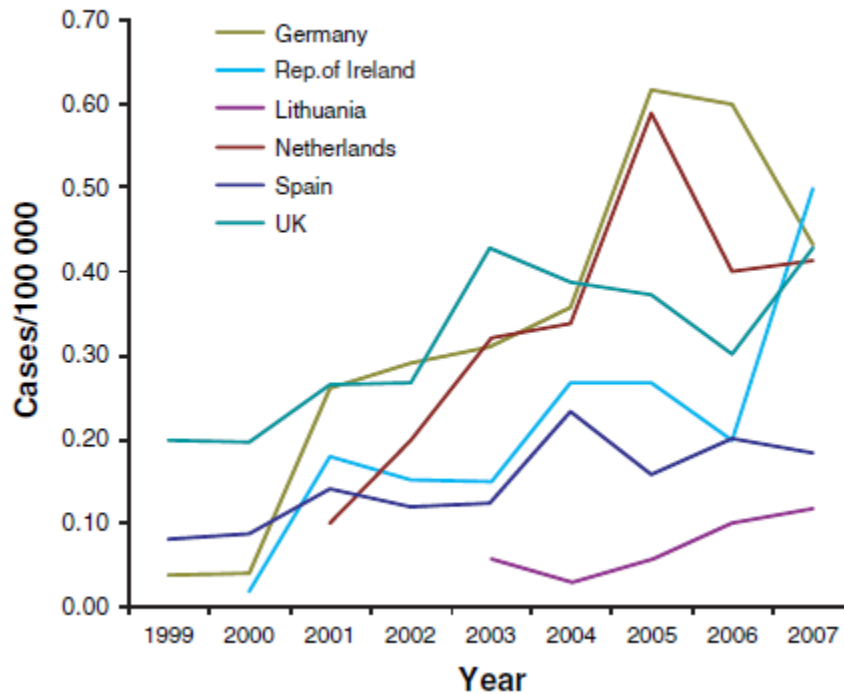
1.2. *Listeria monocytogenes* και τρόφιμα

1.2.1. Κρούσματα λιστερίωσης

Η λιστερίωση είναι μια σοβαρή ασθένεια με υψηλό ποσοστό θνησιμότητας και εισαγωγών σε νοσοκομεία (Mead et al., 1999, Gandhi & Chikindas, 2007). Σύμφωνα με στατιστικές έρευνες του CDC (Centers for Disease Control and Prevention), στις Ηνωμένες Πολιτείες σημειώνονται ετήσια περίπου 1600 κρούσματα λιστερίωσης , περισσότερες από 1400 εισαγωγές σε νοσοκομείο και 260 θάνατοι. (<http://www.cdc.gov/listeria/statistics.html#one> , Scallan et al., 2011). Το ενδεχόμενο πρόκλησης λιστερίωσης κυμαίνεται μεταξύ 0.1 και 11.3/1,000,000 σε διαφορετικές χώρες και έχει ποσοστό θνησιμότητας 20-30% (Swaminathan & Smidt, 2007). Λόγω του υψηλού ποσοστού θνησιμότητας, η λιστερίωση είναι η δεύτερη πιο συχνή αιτία πρόκλησης τροφιμογενούς λοίμωξης με ποσοστά θνησιμότητας στην Ευρώπη (Allerberger & Wagner, 2010).

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είναι ευρέως διαδεδομένος στο περιβάλλον, μπορεί να απομονωθεί από διαφορετικά ενδιαιτήματα όπως χώμα, νερό, βλάστηση, περιττώματα ζώων αλλά και τρόφιμα που μπορεί να προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση (O'Byrne & Karatzas, 2008). Θεωρείται ανθεκτικός μικροοργανισμός (hardy bacteria) λόγω της ικανότητας του να αναπτύσσεται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (0.5-45 °C), pH (4.7-9.2), και ωσμωτικής πίεσης. Η κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων είναι η κυριότερη πηγή μετάδοσης του *L. monocytogenes* και έχουν καταγραφεί τόσο σποραδικές περιπτώσεις λιστερίωσης όσο και μαζικά κρούσματα (Goebel 2001). Ο παθογόνος *L. monocytogenes* έχει βρεθεί σε ποικιλία ωμών και επεξεργασμένων τροφίμων όπως γάλα, γαλακτοκομικά, κρέας και προϊόντα κρεάτων (όπως μοσχάρι, χοιρινό και ζυμούμενα λουκάνικα), ραπανάκια, λάχανο, θαλασσινά και ψάρια. Έχουν αναφερθεί επίσης τρόφιμα όπως μαλακά τυριά , χοιρινό και θαλασσινά να εμπλέκονται σε αρκετά μαζικά κρούσματα λιστερίωσης (Rocourt & Cossart, 1997, Gandhi & Chikindas, 2007).

Οι διατροφικές συνήθειες των καταναλωτών, τα τελευταία χρόνια, που τείνουν προς την κατανάλωση ελάχιστα επεξεργασμένων, έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων και προϊόντων που συντηρούνται υπό ψύξη επηρέασαν τη συχνότητα των κρουσμάτων λιστερίωσης (Rocourt & Bille, 1997, Gandhi & Chikindas, 2007). Στατιστικά στοιχεία δείχνουν ότι τα κρούσματα λιστερίωσης στην Ευρώπη έχουν αυξηθεί από το 2003 μέχρι το 2006 (Σχήμα 1.1) (European Centre for Disease Prevention and Control, 2008).



Σχήμα 1.1 Κρούσματα λιστερίωσης σε έξι ευρωπαϊκές χώρες 1999-2007. (European Centre for Disease Prevention and Control, 2008, Allerberger & Wagner, 2010)

Επιπλέον, στοιχεία από μελέτες ασφάλειας τροφίμων που έχουν διεξαχθεί σε ευρωπαϊκό επίπεδο δείχνουν ότι σημαντικό ποσοστό των έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων βρέθηκε μολυσμένο με *L. monocytogenes*. Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι ο *L. monocytogenes* βρέθηκε στο 1.8% των έτοιμων προς κατανάλωση προϊόντων κρέατος και σε παρασκευάσματα βοδινού κρέατος που ελέγχθηκαν το 2007 (το 0.7% με >100 CFU/g), στο 2.5% των έτοιμων προς κατανάλωση προϊόντων κρέατος και παρασκευασμάτων χοιρινού κρέατος (το 0.6% με >100 CFU/g), στο 2.6% των έτοιμων

προς κατανάλωση προϊόντων και παρασκευασμάτων πουλερικών (το 0.7% με >100 CFU/g), στο 1% των μαλακών και ημι-μαλακών τυριών που φτιάχτηκαν με νωπό ή χαμηλής θερμικής επεξεργασίας γάλα (το 0.3% με >100 CFU/g), και στο 18.3% των έτοιμων προς κατανάλωση προϊόντων ψαριού (το 2.4% με >100 CFU/g) (EFSA 2007).

Ένα από τα αίτια αύξησης των κρουσμάτων είναι η τάση παραγωγής τροφίμων με μεγαλύτερο χρόνο ζωής στον τομέα των έτοιμων προς κατανάλωση προϊόντων. Αυτά είναι τρόφιμα υψηλής επικινδυνότητας για πρόκληση λιστερίωσης γιατί ο παθογόνος έχει δυνητικά αυξημένο χρονικό περιθώριο να πολλαπλασιαστεί (αν το τρόφιμο και οι συνθήκες συντήρησης το επιτρέπουν) και το τρόφιμο δεν θα υποστεί περαιτέρω επεξεργασία (που πιθανόν να θανάτωνε τον παθογόνο) πριν τη στιγμή της κατανάλωσής του (Allerberger & Wagner 2010). Παρ' όλης της δυσκολίας ελέγχου του *L. monocytogenes* στα τρόφιμα, δεδομένης της ανθεκτικότητάς του (hardy organism), εξασφάλιση ορθών χειρισμών/πρακτικών κατά την παραγωγή και αποθήκευση των τροφίμων δύνανται να μειώσουν την επικινδυνότητα.

Ο ευρωπαϊκός κανονισμός (ΕΚ/2073/2005) ορίζει στα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα που δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη του παθογόνου, επιτρεπόμενο πληθυσμό ≤ 100 CFU/g κατά τη διάρκεια διατήρησής τους στην αγορά και απαιτείται απουσία του παθογόνου σε 25 g τροφίμου σε τρόφιμα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς καθώς και σε τρόφιμα που δύνανται να υποστηρίξουν την ανάπτυξη του *L. monocytogenes*.

1.2.2. Φαινόμενο διασταυρούμενης ανθεκτικότητας (Cross protection phenomenon)

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η λιστερίωση μεταφέρεται στον άνθρωπο κυρίως μέσω της κατανάλωσης έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων. Η πρόβλεψη των ορίων ανάπτυξης του *L. monocytogenes* στα τρόφιμα είναι πολύπλοκη καθώς εκτός από τους παράγοντες pH, αλατότητα και θερμοκρασία, η ικανότητα επιβίωσης και ανάπτυξης του παθογόνου

επηρεάζεται και από την πιθανή προηγούμενη έκθεσή του σε παράγοντες ήπιας καταπόνησης (Ryan et al., 2008).

Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι η έκθεση σε υποθανάτιες συνθήκες, όπως αυτές που απαντώνται στα τρόφιμα, μπορεί να επάγει ανθεκτικότητα σε μετέπειτα εντονότερη καταπόνηση, ίδιας φύσεως ή διαφορετική. Συνεπώς η μελέτη της ικανότητας προσαρμογής του *L. monocytogenes* σε όξινες συνθήκες, είναι πολύ σημαντική για την ασφάλεια των τροφίμων, καθώς ορισμένες συνθήκες μπορεί να ενισχύσουν την ικανότητα επιβίωσης του βακτηρίου (Cataldo et al., 2007, Gahan et al., 1996, Leyer and Johnson, 1992, Stopforth et al., 2007, Ryan et al., 2008). Η μολυσματική δόση του *L. monocytogenes* κυμαίνεται μεταξύ 10^6 και 10^9 CFU αλλά μπορεί να εξαρτάται τόσο από τη φύση του τροφίμου όσο και από την κατάσταση της υγείας του ασθενούς (FAO/WHO 2004, FDA/FSIS 2003), δεδομένου ότι η φυσιολογία του μικροοργανισμού και η ανθεκτικότητα που μπορεί να επάγεται από το περιβάλλον του τροφίμου μπορεί να επηρεάζει τη λοιμωξιολογία του δράση ή την ικανότητα επιβίωσης ακραίων συνθηκών (όπως το χαμηλό pH του στομάχου του ξενιστή).

Συγκεκριμένα, βακτηριακές καλλιέργειες που είχαν προσαρμοστεί στις όξινες συνθήκες παρουσίασαν ανθεκτικότητα σε μορφές καταπόνησης, που σχετίζονταν με το περιβάλλον των τροφίμων, όπως ακτινοβολία και θέρμανση (Samelis et al., 2003). Έχει βρεθεί ότι πολλοί παράγοντες καταπόνησης, συμπεριλαμβανομένου αυτών που αποτελούν μέσα συντήρησης των τροφίμων όπως θέρμανση, προσθήκη άλατος, χαμηλό pH, ταυτόχρονα επάγουν προστασία ενάντια σε άλλα είδη καταπονήσεων καθιστώντας τα βακτήρια ικανά να επιβιώσουν σε μετέπειτα έντονες συνθήκες καταπόνησης που διαφορετικά θα επέφεραν κυτταρικό θάνατο (Casey and Condon, 2002, Flahaut et al., 1996, Ryan et al., 2008). Το φαινόμενο αυτό της διασταυρούμενης ανθεκτικότητας (Cross protection phenomenon ή stress hardening) είναι εμφανές στον *L. monocytogenes* (Faleiro et al., 2003, O'Driscoll et al., 1996, Lou and Yousef, 1997, Skandamis et al., 2008, Ryan et al., 2008). Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η προσαρμογή σε ήπιες όξινες συνθήκες προσδίδει ανθεκτικότητα στη θέρμανση, στην παρουσία άλατος και αιθανόλης (O'Driscoll et al., 1996, Ryan et al., 2008), στις βακτηριοσίνες (ένα φαινόμενο που

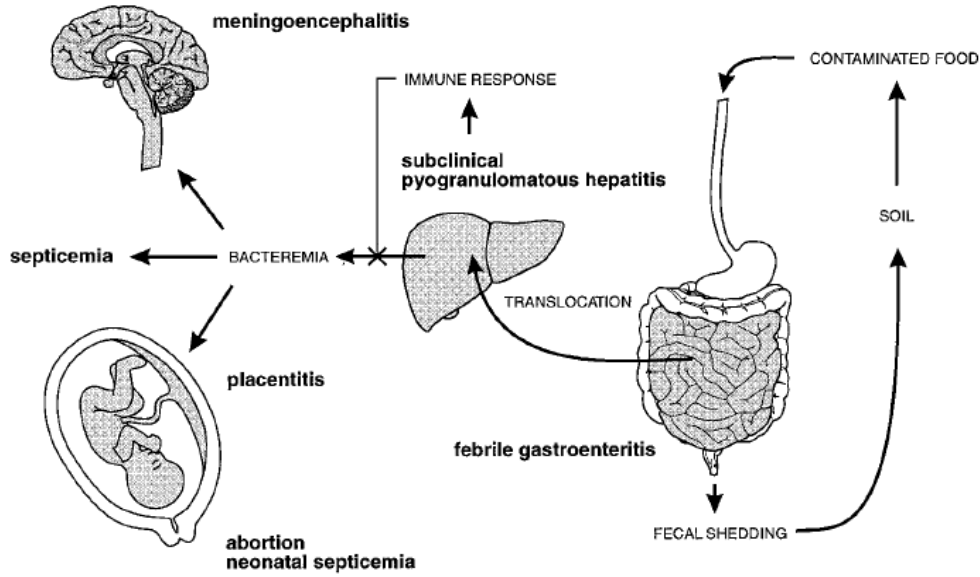
πιθανόν να συνδέεται με τη σύνθεση λιπαρών οξέων της μεμβράνης) (Bonnet and Montville, 2005, van Schaik et al., 1999, Ryan et al., 2008), *in vivo* ανθεκτικότητα σε καταπόνηση, όπως παρουσία χολής (Begley et al., 2002, Ryan et al., 2008) και συνθήκες έντονης όξινης καταπόνησης (Ferreira et al., 2003).

Συνεπώς, είναι πολύ σημαντική η κατανόηση της αλληλεπίδρασης των μέσων συντήρησης τροφίμων (όπως οξίνιση και προσθήκη άλατος) με τη μικροβιακή συμπεριφορά τόσο λόγω επαγωγής ανθεκτικότητας όσο λόγω επίδρασης στη εκδήλωση παθογένειας του παθογόνου.

1.3. Κλινικά χαρακτηριστικά και παθογένεια

Προϋπόθεση για την εκδήλωση συμπτωμάτων λιστερίωσης είναι ή κατάσταση της υγείας του ασθενούς. Οι περισσότεροι ασθενείς που έχουν προσβληθεί από *L. monocytogenes* έχουν φυσιολογικά ή παθολογικά κάποια αδυναμία στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και αυτό δικαιολογεί τον χαρακτηρισμό του *L. monocytogenes* ως ευκαιριακά παθογόνο. Οι ομάδες υψηλού κινδύνου για λιστερίωση είναι οι έγκυες, νεογνά, ηλικιωμένοι και ανοσοκατεσταλμένα άτομα (Goebel et al., 2001).

Ο *L. monocytogenes* προσβάλλει τον άνθρωπο μέσω κατανάλωσης μολυσμένου τροφίμου. Το στομάχι αποτελεί το πρώτο εμπόδιο και όσα κύτταρα επιβιώσουν στο γαστρικό υγρό, περνάνε στο έντερο. Αν και εκεί ο παθογόνος επιβιώσει, το εμπόδιο του εντέρου μεταφέρεται από τους μεσεντέριους λεμφαδένες στη σπλήνα και το συκώτι. Αν δεν ανασταλεί από το ανοσοποιητικό σύστημα, κυρίως στη σπλήνα και το συκώτι η μόλυνση ο *L. monocytogenes* μπορεί να προκαλέσει παρατεταμένη και ασυμπτωματική βακτηριαμία και μπορεί να φτάσει στον εγκέφαλο και τον πλακούντα, προκαλώντας μηνιγγίτιδα και εγκεφαλίτιδα, κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα, αποβολές σε εγκύους και σοβαρές λοιμώξεις σε νεογνά (Lecuit, 2007). **(Σχήμα 1.2)**



Σχήμα 1.2 Σχηματική απεικόνιση της παθοφυσιολογίας του *L. monocytogenes* (Goebel et al., 2001)

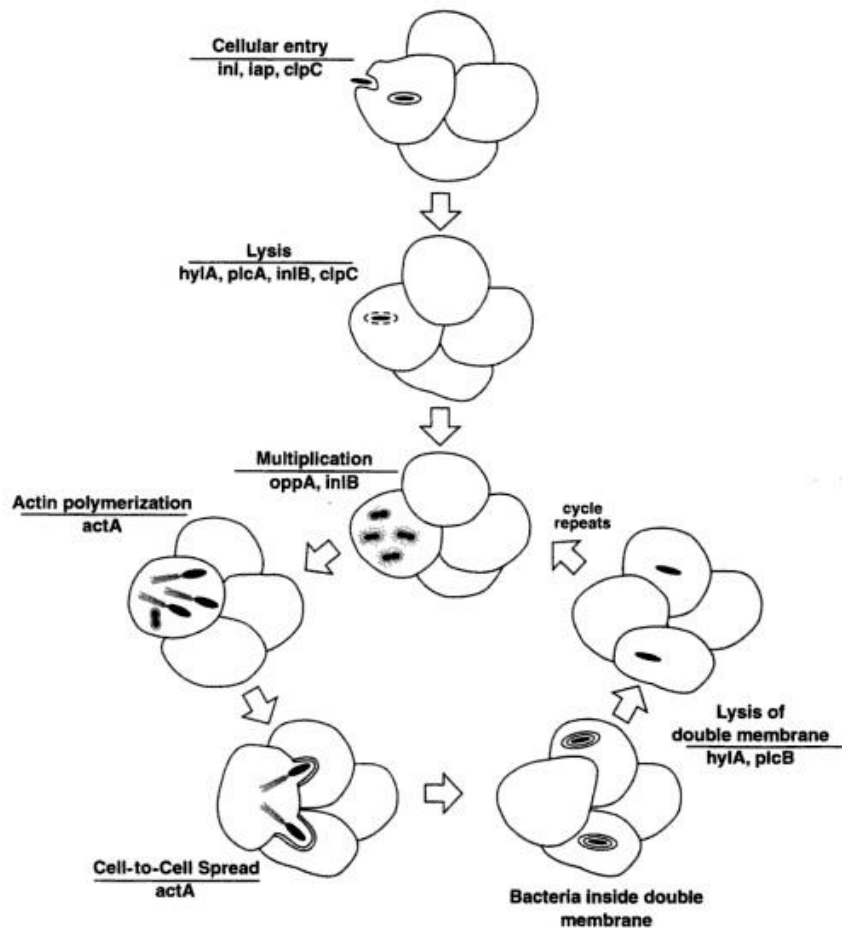
Ο μικροοργανισμός έχει τη δυνατότητα να εισχωρεί σε διάφορα είδη ευκαρυωτικών κυττάρων όπως επιθηλιακά, νευρικά, ινοβλάστες, ηπατοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και σε πολλά είδη νευρικών κυττάρων. Ο κύκλος λοίμωξης του *L. monocytogenes* ξεκινά με την προσκόλληση του στην επιφάνεια του ευκαρυωτικού κυττάρου και τη διείσδυση του βακτηρίου στο κύτταρο του ξενιστή. Ο *L. monocytogenes* έχει τη δυνατότητα να αναγνωρίζει έναν αριθμό διαφορετικών ευκαρυωτικών υποδοχέων.

Αφού ο παθογόνος προσκολληθεί στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή στη συνέχεια εισχωρεί στο εσωτερικό τους και εισέρχεται σε ένα φαγοκυτταρικό χυμοτόπιο. Ο *L. monocytogenes* εξασφαλίζει την επιβίωσή του στο χυμοτόπιο προλαμβάνοντας την ωρίμανση του φαγοσώματος στο φαγολυσosomalικό στάδιο. Διαρρηγνύει τη φαγοσωμική μεμβράνη και έπειτα μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα. Η ρήξη της μεμβράνης είναι σημαντική για την επιβίωση και ανάπτυξη του *L. monocytogenes* και πραγματοποιείται από τη δράση αιμολυσίνης (LLO, Listeriolysin O) σε συνδυασμό με φωσφολιπάσες. Ο παθογόνος περνά γρήγορα από κύτταρο σε κύτταρο μέσω ενός μηχανισμού πολυμερισμού της ακτίνης, στο οποίο συμμετέχει η ActA (Goebel et al., 2001). **(Σχήμα 1.3)**

Οι σημαντικότεροι παράγοντες εκδήλωσης λοιμωξιογόνου δράσης του *L. monocytogenes* είναι :

- ❖ **Αιμολυσίνη** (Listeriolysin O, LLO). Η LLO κωδικοποιείται από το γονίδιο *hly*. Είναι παράγοντας παθογένειας που διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον ενδοκυτταρικό παρασιτισμό. Μια από τις σημαντικότερες δράσεις της στον κύκλο λοίμωξης είναι ότι συμμετέχει στη ρήξη της μεμβράνης του φαγοσώματος. Η LLO επιπλέον είναι απαραίτητη και για την αποτελεσματική απομάκρυνση του παθογόνου από τη διπλή μεμβράνη του κενοτόπιου που βοηθά στη μεταφορά του από κύτταρο σε κύτταρο. Επιπλέον οι βλάβες στη μεμβράνη που προκαλεί η LLO πιθανόν διευκολύνει την είσοδο των φωσφολιπασών στα υποστρώματα, οδηγώντας στην ολική λύση του φυσικού εμποδίου που οριοθετεί το φαγοσωμικό τμήμα.
- ❖ **Φωσφολιπάσες** (PlcA και PlcB). Η PlcB φωσφολιπάση είναι ικανή να διασπά φωσφολιποειδή της μεμβράνης και συμμετέχει στην αντιμετώπιση των φαγοσωμάτων, όπου η σύνθεση και η μεταφορά των λιποειδών στη μεμβράνη οδηγεί στη διάλυση του φυσικού εμποδίου που διαχωρίζει τα βακτήρια από το κυτταρόπλασμα. Η PlcA ενισχύει τη δράση του PlcB και έχει παρατηρηθεί και συνεργιστική αλληλεπίδραση μεταξύ LLO και PlcB στη διάσπαση του φαγοσώματος και λύση της διπλής μεμβράνης του κενοτόπιου που βοηθά στη διαδικασία μεταφοράς του παθογόνου από κύτταρο σε κύτταρο.
- ❖ **ActA**, πρωτεΐνη που προκαλεί τον πολυμερισμό της ακτίνης, ώστε να επιτευχθεί η διακυτταρική μετακίνηση του μικροοργανισμού. Η πρωτεΐνη ActA κωδικοποιείται από το γονίδιο *actA*.
- ❖ **Ιντερναλίνες**, πρωτεϊνικά προϊόντα γονιδίων που σχετίζονται με την παθογένεια. Οι κυριότερες πρωτεΐνες αυτής της κατηγορίας έχουν χαρακτηριστεί οι InlA και InlB, που κωδικοποιούνται από το οπερόνιο *inlAB*. Οι InlA και InlB είναι απαραίτητες για τη διείσδυση του *L. monocytogenes* στα κύτταρα του ξενιστή καθώς μελέτες που έδειξαν μειωμένη ικανότητα εισχώρησης στα στελέχη που είχαν απενεργοποιημένο το *inlAB*. Εκτός από το οπερόνιο *inlAB*, έξι επιπλέον γονίδια κωδικοποιούν ιντερναλίνες, τα *inlC2*, *inlD*, *inlE*, *inlF*, *inlG*, και *inlH*. Η έκφραση του οπερονίου *inlAB* εξαρτάται από τον ρυθμιστή παθογένειας του *L. monocytogenes*, PrfA.

Οι πρωτεΐνες που αναφέρθηκαν παραπάνω είναι παράγοντες που συμμετέχουν στη λοιμωξιγόνο δράση διότι εκτελούν λειτουργίες απαραίτητες για τον παρασιτισμό του *L. monocytogenes* στον ξενιστή. Εκτός από τους παραπάνω παράγοντες, ο μικροοργανισμός διαθέτει και άλλους που δρουν έμμεσα στην εκδήλωση λοιμογόνου δράσης στον ξενιστή. Ο ρόλος τους είναι πολύ σημαντικός για το τελικό αποτέλεσμα εκδήλωσης της παθογένειας. Αυτοί είναι οι πρωτεΐνες $\rho\beta\theta$ (*iap*), αντιοξειδωτικοί παράγοντες, η πρόσληψη μεταλλικών ιόντων και παράγοντες απόκρισης στην καταπόνηση (Goebel et al., 2001).



Σχήμα 1.3. Σχηματική αναπαράσταση διαφορετικών σταδίων της διαδικασίας λοίμωξης του ξενιστή από τον *L. monocytogenes* και τα γονίδια λοιμογόνου δράσης που συμμετέχουν σε κάθε στάδιο αυτής της διαδικασίας. (Miliotis & Bier, 2003)

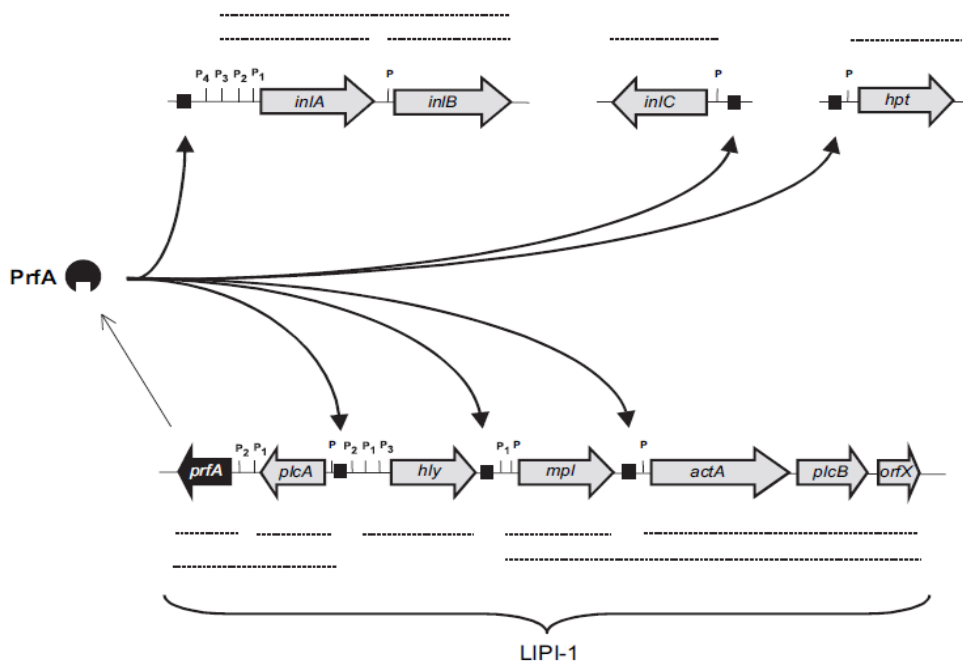
1.3.1. Ο ρόλος του ρυθμιστικού παράγοντα PrfA στη λοιμοξιογόνο δράση

Η πρωτεΐνη PrfA είναι μέλος της οικογένειας των Crp/Cap-Fnr μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων παθογένειας στον *L. monocytogenes*. Η έκφραση γονιδίων παθογένειας επάγεται από τον PrfA κατά τη διάρκεια του κύκλου λοίμωξης από τον *L. monocytogenes* στους διαφορετικούς τύπους ευκαρυωτικών κυττάρων (Joseph et al., 2006, Chatterjee et al., 2006, Scortti et al., 2007). Τα γονίδια αυτά οργανώνονται σε επτά μεταγραφικές μονάδες, όπου οι τέσσερις είναι ομαδοποιημένες στο LIPI-1 (*Listeria* pathogenicity island 1), μια νησίδα παθογένειας απαραίτητη για την εκδήλωση της λοιμογόνου δράσης του *L. monocytogenes* (Goebel & Kreft, 2001, Scortti et al., 2007) (**Σχήμα 1.4**). Το γονίδιο *hly* κωδικοποιεί την αιμολυσίνη Ο (LLO). Το *mpl-actA-plcB-orfX* οπερόνιο μπορεί να μεταγραφεί είτε σαν ολοκληρωμένο μεταγράφημα 5.7 kb από τον προαγωγέα *Pmpl*, είτε σαν δύο μικρότερα μετάγραφα, το ένα ειδικό για το *mpl* και το άλλο αρχίζοντας από τον *PactA* προαγωγέα. Το *mpl* κωδικοποιεί μια μεταλλοπρωτεάση που συμμετέχει στην εξωκυτταρική ωρίμανση του πρωτεϊνικού προϊόντος του *plcB*. Το *actA*, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη επιφανείας Acta και το *plcB* κωδικοποιεί τη φωσφολιπάση C με ευρεία υποστρωμάτων που δρά συνεργιστικά με την LLO. Το *plcA-prfA* οπερόνιο κωδικοποιεί την PlcA (phosphatidylinositol-specific phospholipase C), που δρά συνεργιστικά με την LLO και PlcB στη φαγοκυττάρωση κενοτόπιου, και τον PrfA.

Τα άλλα τρία τμήματα του ρυθμιζόνιου που είναι εξαρτώμενα από τον PrfA βρίσκονται σε διαφορετικά σημεία του χρωμοσώματος του *L. monocytogenes* και είναι το *inlAB*, που κωδικοποιεί τις ιντερναλίνες A (InlA) και B (InlB), το *inlC* κωδικοποιεί μία μικρή εκκρινόμενη ομόλογη ιντερναλίνη απαραίτητη για την εκδήλωση παθογένειας στα ποντίκια (Engelbrecht et al., 1996) αλλά ο ρόλος τους στην παθογένεια δεν έχει διαλευκανθεί. Το τελευταίο τμήμα του PrfA κωδικοποιεί έναν μεταφορέα φωσφορικής εξόζης, απαραίτητο για τη βακτηριακή ανάπτυξη στο κύτταρο του ξενιστή και στο κυτταρόπλασμα (Chico-Calero, 2002, Scortti et al., 2007).

Πολλά γονίδια παθογένειας είναι έμμεσα εξαρτώμενα από τον PrfA (Milohanic et al., 2007, Marr et al., 2006, Scortti et al., 2007). Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν το γονίδιο

bsh, (bile salt hydrolase) το οποίο κωδικοποιεί την υδρολάση χολικών αλάτων, που βοηθά στην αποίκηση του παθογόνου στον εντερικό σωλήνα (Dussurget et al., 2002, Scortti et al., 2007), μεταφορείς, μεταβολικά ένζυμα, μεσολαβητές απόκρισης στην καταπόνηση και ρυθμιστές έκφρασης. Μελέτες έχουν αναφέρει και την έμμεση δράση του PrfA στη ρύθμιση των γονιδίων: *nir* που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη επιφανείας σημαντική για την παθογένεια του μικροοργανισμού (Cabanes et al., 2005, Scortti et al., 2007) των γονιδίων *sipXYZ* πεπτιδάσης σήματος τύπου 1 (Raynaud et al., 2005) και του *bilEAB* που κωδικοποιεί το σύστημα αποκλεισμού χολής (Sleator et al., 2005). Υπάρχουν επίσης στοιχεία ότι ο PrfA προκαλεί αρνητική ρύθμιση του γονιδίου *clpC* (Ripio et al., 1998) κωδικοποιώντας μια πρωτεΐνη για την επιβίωση σε συνθήκες καταπόνησης (Rouquette et al., 1996) και το γονίδιο *motA* που σχετίζεται με τα μαστίγια κίνησης (Michel et al., 1998). Η έμμεση εξάρτηση αυτών των γονιδίων από τον PrfA υποδεικνύει ότι συμβάλλει και στη ρύθμιση των γονιδίων που συμμετέχουν στην ομοιόσταση του *L. monocytogenes*.



Σχήμα 1.4 Η μεταγραφική οργάνωση της νησίδας παθογένειας-1 του *L. monocytogenes* (LIPI-1): Το *inAB* οπερόνιο και τα γονίδια *inC* και *hpt* στα δεξιά της θετικής αλυσίδας. Τα σημεία που δρα ο PrfA σημειώνονται με μαύρα τετράγωνα, γνωστοί εκκινήτες και μεταγραφώματα σημειώνονται με “P” και διαδοχικές τελείες αντίστοιχα. (Scortti et al., 2007)

1.3.2. Ο ρόλος του ρυθμιστικού παράγοντα σ^B στη λοιμωξιολογία δράση

Μελέτες έχουν δείξει ότι τόσο το γονίδιο *sigB* (που κωδικοποιεί τον ρυθμιστικό παράγοντα σ^B) όσο και το *prfA* συμμετέχουν στην παθογένεια του *L. monocytogenes*, ρυθμίζοντας τη μεταγραφή σχετιζόμενων με τη λοιμωξιολογία δράση γονιδίων (Kazmierczak et al., 2006, 2003). **(Σχήμα 1.5)**

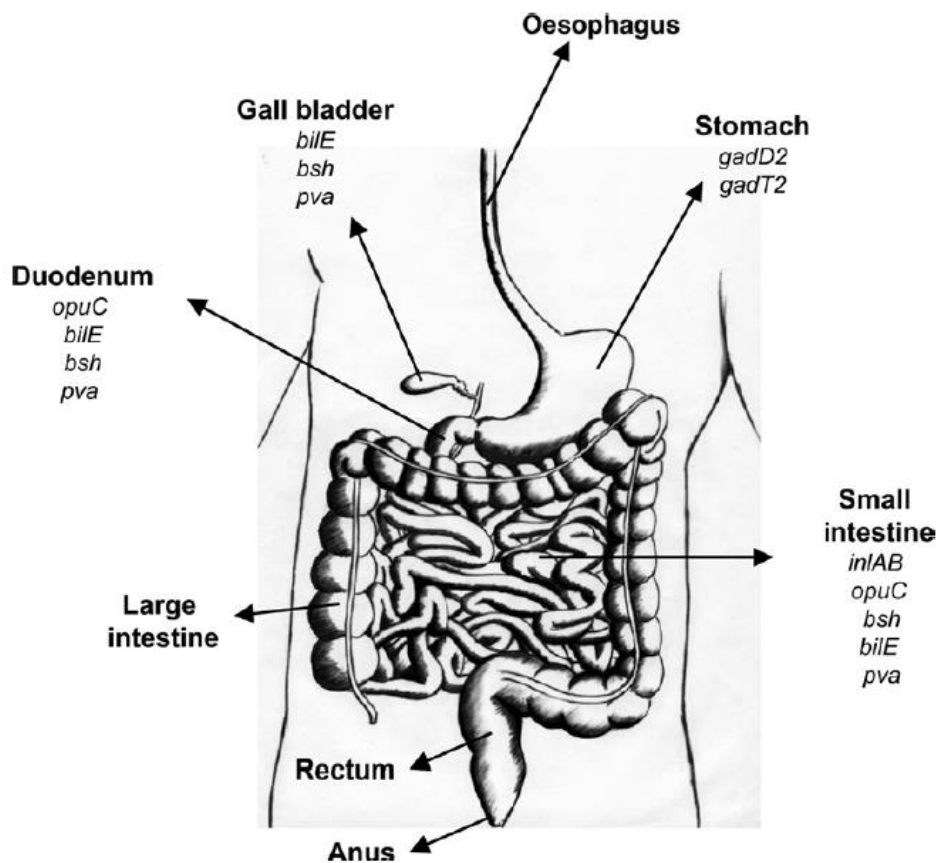
Συγκεκριμένα, ο σ^B συμβάλλει στην ικανότητα επιβίωσης στο όξινο περιβάλλον του στομάχου, το πρώτο εμπόδιο άμυνας του ξενιστή, μέσω της ενεργοποίησης του συστήματος GAD (*gad1*, *gad2*, *gad3*). Όπως αναφέρουν οι Ferreira et al., (2003), το στέλεχος *ΔsigB* ήταν πιο ευαίσθητο στο τεχνητό γαστρικό υγρό, οι μηχανισμοί απόκρισης στην όξινη καταπόνηση και συμμετοχή του σ^B αναλύονται στην [ενότητα 1.4.](#)

Όταν το βακτήριο απομακρυνθεί από το στομάχι, περνά στη χοληδόχο κύστη όπου εκκρίνεται η χολή, σε αυτό το στάδιο ο σ^B συμβάλλει στη ρύθμιση μεταγραφής γονιδίων που σχετίζονται με ανθεκτικότητα στη χολή, συμπεριλαμβανομένου του *bsh* το οποίο κωδικοποιεί την υδρολάση των χολικών αλάτων (Dussurget et al., 2002) και το οπερόνιο *bilE* (*oruB*) το οποίο κωδικοποιεί το σύστημα αποκλεισμού της χολής (Sleator et al., 2005). Η απενεργοποίηση του γονιδίου *bilE* είχε σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση της χολής ενδοκυτταρικά, υποδεικνύοντας ότι η πρωτεΐνη BilE πιθανόν να λειτουργεί σαν μεταφορέας της χολής έξω από το κύτταρο και η μεταγραφή του γονιδίου *bilE* ήταν σημαντικά μειωμένη στο στέλεχος *ΔsigB*, γεγονός που συνδυάζεται με την παρουσία σημείου πρόσδεσης του σ^B -εξαρτώμενου εκκινήτη πριν το κωδικόνιο έναρξης του *bilE* (Sleator et al., 2005).

Κατά το πέρασμα από τον δωδεκαδάκτυλο και το λεπτό έντερο ο *L. monocytogenes* αντιμετωπίζει την ωσμωτική καταπόνηση με συσσώρευση διαλυμένων ωσμοπροστατευτικών ουσιών. Ένα σύστημα αντιμετώπισης της καταπόνησης παρουσία άλατος που ρυθμίζεται από τον σ^B είναι το *OpuC*, υπεύθυνο για τη μεταφορά της βεταΐνης και καρνιτίνης (O'Byrne & Karatzas, 2008). Οι μηχανισμοί απόκρισης στην ωσμωτική καταπόνηση και συμμετοχή του σ^B αναλύονται στην [ενότητα 1.5.1.](#)

Επιπλέον ο σ^B επηρεάζει την ικανότητα εισχώρησης στα επιθηλιακά κύτταρα μέσω της συμμετοχής του στη ρύθμιση και τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν τις ιντερναλίνες, συμπεριλαμβανομένου των *inlA* και *inlB* που κωδικοποιούν την ινερναλίνη A και B. (Kazmierczak et al., 2003, McGann et al., 2007) και των *inlC2* και *inlD* (McGann et al., 2007, O'Byrne & Karatzas 2008). Η έκφραση των *inlA* και *inlB* εξαρτάται από τον *prfA*, όπως αναφέρθηκε στην [ενότητα 1.3.1](#). Ωστόσο οι McGann et al., (2007) αναφέρουν ότι η διαγραφή του *prfA* δεν επηρεάζει δραματικά τα επίπεδα των *inlA* και *inlB*, εκτός αν συνδυαστεί και με διαγραφή του *sigB*. Αντίθετα η διαγραφή του *sigB* επηρέασε τα επίπεδα έκφρασης των *inlA* και *inlB* (McGann et al., 2007). Σημαντικά, ο σ^B συμβάλλει και στη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν το σημαντικότερο για τον *L. monocytogenes* ρυθμιστή παθογένειας, PrfA (Nadon et al., 2002, Schwab et al., 2005, Chaturongakul et al., 2008).

Επιπρόσθετα, ο PrfA άμεσα ή έμμεσα ενεργοποιεί κάποια γονίδια συνεργιστικά με τον σ^B . Αλληλουχίες όμοιες με τους εκκινητές του σ^B εντοπίζονται πριν από την έναρξη 22 γονιδίων των οποίων η μεταγραφή εξαρτάται από τον PrfA (Milohanic et al., 2003). Κάποια από αυτά τα γονίδια (*lmo2391*, *lmo2748*, *lmo0913*, και *oruCA*) είναι γνωστό ότι ρυθμίζονται από τον σ^B και αυτή η διπλή ρύθμιση μπορεί να υποδηλώνει μια τάση του παθογόνου να ισορροπεί μεταξύ ενεργοποίησης μηχανισμών λοιμωξιογόνου δράσης και μηχανισμών απόκρισης σε πιθανές συνθήκες καταπόνησης (O'Byrne & Karatzas, 2008).



Σχήμα 1.5 Τα σ^B -εξαρτώμενα γονίδια απαραίτητα για την επιβίωση και τον αποικισμό του *L. monocytogenes* στον ξενιστή. Τα κύτταρα *L. monocytogenes* εισέρχονται στον οργανισμό μέσω μολυσμένου τροφίμου, περνάνε από τον οισοφάγο και εισέρχονται στο στομάχι όπου τα γονίδια *gadD2* και *gadT2* διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του στις όξινες συνθήκες. Στο δωδεκαδάχτυλο, ο συνδυασμός της υψηλής οσμωτικής πίεσης και της χολής ενεργοποιούν την έκφραση των *opuCA*, *bsh* και *bile*. Στη χοληδόχο κύστη τα γονίδια *bsh*, *bile* και *pva* βοηθούν στην επιβίωση του παθογόνου. Όταν τα κύτταρα βρίσκονται στο λεπτό έντερο τα γονίδια που ενεργοποιούνται είναι τα *opuCA*, *bsh* και *bile*, και τέλος τα *inlA* και *inlB* τα οποία βοηθούν στην εισχώρηση στα επιθηλιακά κύτταρα και ρυθμίζονται από τον PrfA (O'Byrne & Karatzas, 2008).

1.3.3. Παθογένεια και καταπόνηση

Η ικανότητα πολλών παθογόνων μικροοργανισμών να προσαρμόζονται και να επιβιώνουν αντίξωων περιβαλλοντικών αλλαγών, μπορεί να βελτιώσει την ικανότητα επιβίωσης σε μετέπειτα εντονότερη καταπόνηση και σχετίζεται άμεσα και με την

πιθανότητα εκδήλωσης ασθένειας (Ryan et al., 2008). Η παθογένεια που εκδηλώνει ο *L. monocytogenes* εξαρτάται από τη φυσιολογία του μικροοργανισμού κατά την προσβολή του ξενιστή η οποία καθορίζεται και από παράγοντες όπως η παρουσία περιβαλλοντικών καταπονήσεων και αποκρίσεις που έχουν ενεργοποιηθεί για την αντιμετώπιση αυτών, πριν την εισβολή του μικροοργανισμού στον ξενιστή. Συγκεκριμένα, έρευνες έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση γονιδίων παθογένειας όπως και η βέλτιστη ικανότητα προσκόλλησης και εισχώρησης στα επιθηλιακά κύτταρα έχει συσχετιστεί με την επαγωγή ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση (acid tolerance response-ATR) των κυττάρων *L. monocytogenes* (Conte et al., 2000, Garner et al., 2006, Olsen et al., 2005, Werbrouck et al., 2009, Soni et al., 2011).

Οι Conte et al., (2000) έδειξαν ότι εκδηλώνεται βέλτιστη ικανότητα εισχώρησης στα επιθηλιακά κύτταρα σε συνδυασμό με βελτιωμένη ικανότητα επιβίωσης και πολλαπλασιασμού σε ενεργοποιημένα μακροφάγα ποντικών, στα κύτταρα *L. monocytogenes* που είχαν προηγουμένως εκτεθεί σε ήπιες όξινες συνθήκες παρουσία οργανικών οξέων (Conte et al., 2000). Οι Werbrouck et al. (2009) περιέγραψαν στη μελέτη τους αυξημένη ικανότητα εισχώρησης και αυξημένα επίπεδα InlA mRNA σε κύτταρα που είχε ενεργοποιηθεί ανθεκτικότητα στην όξινη καταπόνηση. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι η καταπόνηση που προκαλείται παρουσία NaCl σχετίζεται με υπερέκφραση γονιδίων παθογένειας και ανθεκτικότητας σε παράγοντες καταπόνησης, υποδεικνύοντας ότι η προσαρμογή στην ωσμωτική καταπόνηση που μπορεί να συμβεί όσο το τρόφιμο περνά από την αλυσίδα παραγωγής τροφίμων μπορεί να ενισχύσει την ικανότητα εκδήλωσης παθογένειας του μικροοργανισμού (Kazmierczak et al., 2003, Olesen et al., 2009, Sue et al., 2004, Soni et al., 2011). Οι Garner et al., (2006) έδειξαν ότι η παρουσία άλατος και οργανικών οξέων αύξησε την ικανότητα εισχώρησης στα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα Caco-2 (Garner et al., 2006). Άλλες μελέτες αναφέρουν ότι φαινοτυπικά αυξήθηκε η ικανότητα προσκόλλησης και εισχώρησης των κυττάρων *in vitro* που είχαν προσαρμοστεί σε καταπόνηση παρουσία NaCl (Olesen et al., 2009, Soni et al., 2011). Σε μοριακό επίπεδο, αναφέρεται ακόμη ότι η παραμονή του παθογόνου σε ήπιες συνθήκες όξινης και ωσμωτικής καταπόνησης επάγει αυξημένα επίπεδα

μεταγραφής του γονιδίου παθογένειας *prfA* (Makariti et al., 2015) και των γονιδίων *inlA* και *bsh* (Sue et al., 2004).

1.4. Επιβίωση του *L. monocytogenes* σε συνθήκες όξινης καταπόνησης

Η οξίνιση των τροφίμων είναι από τις παλαιότερες μεθόδους συντήρησης των τροφίμων και αποτελεί πρωταρχικό εμπόδιο για την αναστολή παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένου και του *L. monocytogenes* που αναπτύσσεται ιδανικά σε ουδέτερο pH. Ο παθογόνος, κατά την είσοδο του στον ανθρώπινο οργανισμό, περνά μέσα από τον γαστρεντερικό σωλήνα, πρέπει να επιβιώσει παρουσία όξινων συνθηκών στο στομάχι, όπως και παρουσία των λιπαρών οξέων στο έντερο. Επιπλέον, ο *L. monocytogenes* ως προαιρετικά ενδοκυτταρικό παθογόνο αντιμετωπίζει το χαμηλό pH φαγολυσοσώματος μακροφάγων (Abee & Wouters, 1999) αλλά χρειάζεται πτώση της τιμής του pH ώστε να ενεργοποιηθεί η αιμολυσίνη, η τοξίνη που τη βοηθά να απομακρύνεται από το φαγόσωμα (Cotter & Hill, 2003). Ο παθογόνος ανταποκρίνεται και επιβιώνει στα όξινα αυτά περιβάλλοντα χρησιμοποιώντας μια σειρά από μηχανισμούς προσαρμογής στην καταπόνηση όπως το σύστημα αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού και το απαμινάσης της αργινίνης

1.4.1. Ρόλος του συστήματος αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού (glutamate decarboxylase system, GAD)

Ο *L. monocytogenes*, όπως και άλλα βακτήρια που χρειάζονται να διασχίσουν το όξινο περιβάλλον του στομάχου για να εισχωρήσουν στα κύτταρα του ξενιστή όπως η *Escherichia coli* (Smith et al., 1992), *Shigella flexneri* (Waterman & Small, 1996) κ.α., χρησιμοποιεί το σύστημα αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού (glutamate decarboxylase system, GAD), για να επιβιώσει στην όξινη καταπόνηση αντιμετωπίζοντας την πτώση του pH του κυτταροπλάσματος (Cotter et al., 2001).

Το σύστημα GAD περιλαμβάνει δύο πρωτεΐνες, το ένζυμο αποκαρβοξυλάση του γλουταμινικού σε συνδυασμό με τον αντιμεταφορέα γλουταμινικού/Υ-αμινοβουτυρικού. Πολλά στελέχη του *L. monocytogenes* διαθέτουν γονίδια που κωδικοποιούν τρεις

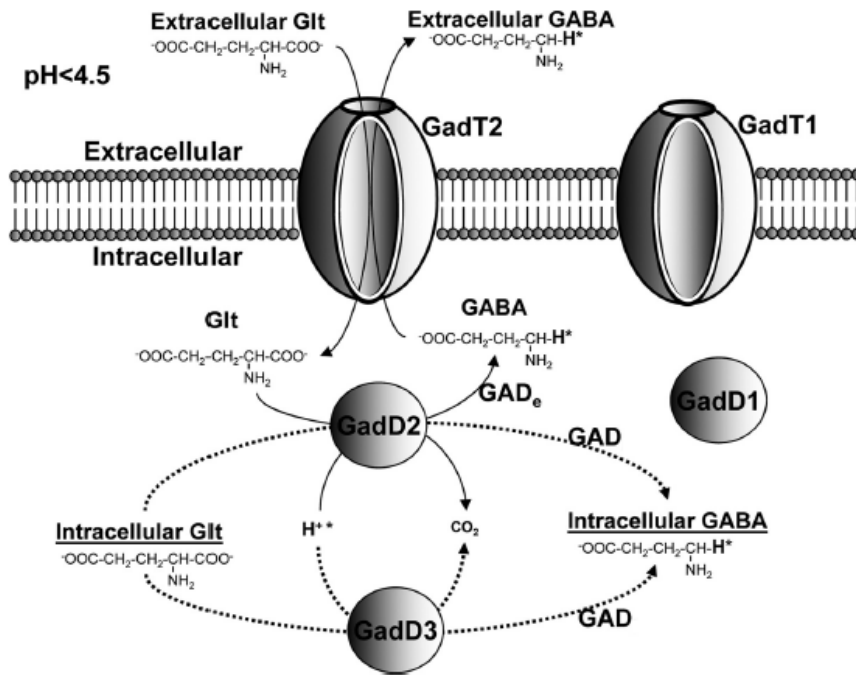
αποκαρβοξυλάσες, τα γονίδια *gadD1*, *gadD2* και *gadD3* και δύο αντιμεταφορείς γλουταμινικού, τα *gadT1* και *gadT2*. Αυτά είναι οργανωμένα σε δύο ζεύγη *gadDIT1* και *gadD2T2* και το ανεξάρτητο *gadD3* (Cotter et al., 2005). Τα γονίδια *gadD2T2* διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση σε συνθήκες έντονης όξινης καταπόνησης (pH 2.8), ενώ το *gadD1* συμμετέχει στην ανάπτυξη σε ήπιες όξινες συνθήκες (pH 5.1) και επάγεται η έκφραση του κατά τη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Όσον αφορά τον ρόλο του *gadD3*, είναι ακόμα άγνωστος γιατί τα στελέχη που είχαν απενεργοποιημένο το γονίδιο αυτής την αποκαρβοξυλάσης, δεν κατάφεραν να αναπτυχθούν (Cotter et al., 2005). Ωστόσο οι Karatzas et al., (2012) μελετώντας την ικανότητα διατήρησης ομοιόστασης του pH μέσω του συστήματος GAD στον *L. monocytogenes* αναφέρουν ότι σε όξινες συνθήκες (pH 4.0) το γονίδιο *gad2* είχε τη μεγαλύτερη συμμετοχή στην αντιμετώπιση ήπιας όξινης καταπόνησης (Karatzas et al., 2012). Είναι γνωστό ότι η λειτουργικότητα του συστήματος GAD διαφέρει μεταξύ διαφορετικών στελεχών *L. monocytogenes* για παράδειγμα ο ορότυπος 4b *L. monocytogenes* δε διαθέτει το γονίδιο *gadDIT1*, παρ'όλα αυτά έχει την ικανότητα να επιβιώνει και να εκδηλώνει παθογένεια (Cotter et al., 2005). Είναι πιθανόν το *gad2* να αντισταθμίζει την απουσία του *gad1* διότι όπως αναφέρουν και οι Cotter et al., (2001) τα στελέχη Δ *gad2* εκδήλωσαν χαμηλή οξεοανθεκτικότητα, ενώ τα στελέχη Δ *gad1* διατήρησαν την ικανότητα να προσαρμόζονται στις ήπιες όξινες συνθήκες (pH 5.5) και να επιβιώνουν έντονη όξινη καταπόνηση. Αυτό υποδεικνύει ότι το *gad2* συμμετέχει σημαντικά στην προσαρμογή σε ήπιες όξινες συνθήκες.

Το σύστημα GAD είναι απαραίτητο για την επιβίωση σε όξινες συνθήκες, όπως αναφέρουν και οι Cotter et al., (2001 a) η διαγραφή των γονιδίων *gadA*, *gadB* και *gadC* (πλέον ονομαζόμενα *gadD1*, *gadD2* και *gadD3*) σε στελέχη είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη ευαισθησία των κυττάρων σε χαμηλό pH. Αυτό υποδεικνύει ότι το λειτουργικό σύστημα GAD είναι ζωτικό για την αντιμετώπιση της όξινης καταπόνησης του *L. monocytogenes* ώστε να επιβιώνει περνώντας μέσα από το γαστρικό περιβάλλον και να μολύνει το λεπτό έντερο. Επιπλέον το σύστημα GAD αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην επαγωγή ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση (ATR) καθώς η έλλειψη των ενζύμων του συστήματος GAD μείωσε σημαντικά την προσαρμογή στις όξινες συνθήκες

στα στελέχη που είχαν απενεργοποιηθεί τα σχετικά γονίδια. Ωστόσο επάγεται μερική ανθεκτικότητα στην όξινη καταπόνηση υποδεικνύοντας ότι συμμετέχουν και άλλοι μηχανισμοί στην εκδήλωση ATR.

Κατά τη λειτουργία του συστήματος GAD, το γλουταμινικό μεταφέρεται στο κύτταρο μέσω ειδικού μεταφορέα μετά την αποκαρβοξυλίωση στο κυττόπλασμα όπου παράγεται το Υ-αμινοβουτυρικό με τη χρήση ενός ενδοκυτταρικού πρωτονίου. (Small & Waterman, 1998, Gandhi & Chikindas, 2007). Το Υ-αμινοβουτυρικό (GABA) που παράγεται από την αντίδραση αποκαρβοξυλίωσης στη συνέχεια ανταλλάσσεται στην κυτταρική μεμβράνη με ένα εξωκυτταρικό μόριο γλουταμινικού από τον αντιμεταφορέα γλουταμινικού-Υ-αμινοβουτυρικού, και έπειτα το σύστημα καθίσταται έτοιμο να καταναλώσει επόμενο ενδοκυτταρικό πρωτόνιο (**Σχήμα 1.6**). Κατά την αντίδραση παράγεται ATP και αυτό συμβάλλει και στη διαδικασία ομοιόστασης του pH που πραγματοποιείται από την F₀F₁-ATPase (Higuchi et al., 1997, Ryan et al., 2008), η οποία συμμετέχει σε έναν άλλο μηχανισμό αντιμετώπισης της όξινης καταπόνησης. Η απώλεια πρωτονίων από το κύτταρο έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του pH του κυτταροπλάσματος και την απελευθέρωση αλκαλικού Υ-αμινοβουτυρικού στο περιβάλλον, με συνέπεια τη σταδιακή αύξηση του εξωτερικού pH (Small & Waterman, 1998, Gandhi & Chikindas, 2007). Όπως έχει ανασκοπηθεί από τους Ryan et al. (2008) παράγοντες που έχουν συσχετιστεί με το γαστρεντερικό σύστημα (χαμηλό pH, αναερόβιες συνθήκες, υπο και υπερ ωσμωτικό σοκ, χολικά άλατα, και ιόντα χλωρίου) έχει βρεθεί ότι επάγουν την έκφραση του συστήματος GAD σε πολλά βακτήρια

Το σύστημα GAD έχει μελετηθεί σε πολλές έρευνες αφού διαδραματίζει τον σημαντικότερο ρόλο στην αντιμετώπιση του όξινης καταπόνησης στον *L. monocytogenes*. Ωστόσο, τα διαφορετικά στελέχη *L. monocytogenes* διαφέρουν στην ικανότητα προσαρμογής στις όξινες συνθήκες (Dykes and Moorhead, 2000) και η παραλλακτικότητα που υπάρχει σε επίπεδο στελέχους συνδέεται με την ικανότητα επιβίωση στο υπερ-όξινο περιβάλλον του γαστρικού υγρού (Conte et al., 2002, Cotter et al., 2001a, Olier et al., 2004).



Σχήμα 1.6 Απεικόνιση του συστήματος GAD κατά την έντονη όξινη καταπόνηση $pH \leq 4.5$. Ο μεταφορέας GADT2 μεταφέρει εξωκυτταρικά μόρια Glt, τα οποία αποκαρβοξυλιώνονται από το GAD2 σε GABA με την ταυτόχρονη κατανάλωση πρωτονίου (H^+). Το GABA στη συνέχεια απομακρύνεται από το GadT2 με την ταυτόχρονη πρόσληψη Glt (Karatzas et al., 2012).

1.4.2. Ρόλος του συστήματος απαμινάσης της αργινίνης (arginine deiminase, ADI)

Εκτός από το σύστημα GAD ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* διαθέτει και άλλους μηχανισμούς για την αντιμετώπιση της όξινης καταπόνησης, όπως το σύστημα απαμινάσης της αργινίνης (ADI). Η αργινίνη μεταφέρεται στο κύτταρο σε ανταλλαγή με ένα μόριο ορνιθίνης μέσω ενός μεταφορέα αργινίνης-ορνιθίνης (που κωδικοποιείται από το *arcD*) και τα ένζυμα καταβολίζουν την αργινίνη σε ορνιθίνη, αμμωνία και διοξείδιο του άνθρακα. Για κάθε mole αργινίνης που καταβολίζεται από το σύστημα απαμινάσης της αργινίνης παράγονται δύο mole αμμωνίας, τα οποία προσλαμβάνουν ενδοκυτταρικά πρωτόνια για να παράγουν ιόντα αμμωνίας (NH_4^+). Αυτή η αντίδραση αυξάνει το ενδοκυτταρικό pH βοηθώντας στην ομοιοστάση του pH και στην επιβίωση στο δυσμενές

περιβάλλον που θα μπορούσε να επιφέρει κυτταρικό θάνατο (Ryan et al., 2009). Επιπλέον η παραγωγή ATP κατά την αντίδραση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξώθηση πρωτονίων μέσω της F₁F₀-ATPάσης (Higuchi et al., 1997), ενός ενζύμου που βοηθά στην ομοιόσταση του pH, το οποίο είτε καταλύει τη σύνθεση του ATP όταν τα πρωτόνια μεταφέρονται από το εξωτερικό περιβάλλον στο κυτόπλασμα, είτε υδρολύει το ATP όταν τα πρωτόνια μεταφέρονται έξω από το κύτταρο. Το σύστημα απαμινάσης της αργινίνης περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες ArgA, ArgB, ArgC και ArgD για τη μετατροπή αργινίνης σε ορνιθίνη και η διαγραφή των λειτουργικών γονιδίων του συστήματος ADI είχε ως αποτέλεσμα περιορισμένη ανάπτυξη σε ήπιες όξινες συνθήκες (pH 4.8) και επιβίωση σε θανατηφόρες όξινες συνθήκες (pH 3.5) (Ryan et al., 2009).

1.4.3. Ρόλος του παράγοντα σ^B στην όξινη καταπόνηση

Οι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει συστήματα σηματοδότησης, τα οποία παρουσία περιβαλλοντικών παραγόντων καταπόνησης, ελέγχουν τη συντονισμένη έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τους κυτταρικούς μηχανισμούς άμυνας (Abee & Wouters, 1999). Η επαρκής μεταγραφική απόκριση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην περιβαλλοντική προσαρμογή και ο επαναπρογραμματισμός της μεταγραφής επιτυγχάνεται μέσα από πολλά μονοπάτια σηματοδότησης (O'Byrne & Karatzas, 2008).

Όπως έχει ανασκοπηθεί από τους Melo et al., (2015), πολλοί παράγοντες σίγμα (σ) έχουν συσχετιστεί με την απόκριση στην καταπόνηση σε πολλά gram θετικά βακτήρια όπως *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.* και *L. monocytogenes*. Οι παράγοντες σίγμα είναι υπομονάδες της προκαρυωτικής RNA πολυμεράσης, υπεύθυνη για την αναγνώριση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA, των προαγωγέων. Η αναγνώριση του εκκινήτη από την πολυμεράση ενεργοποιείται υπό συνθήκες που επιδρούν στην ομοιόσταση του βακτηριακού κυττάρου. Στον *L. monocytogenes* ο παράγοντας σίγμα B (σ^B) ρυθμίζει περίπου 140 γονίδια που σχετίζονται με την απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης παρουσία οξέων, υψηλών συγκεντρώσεων άλατος, χαμηλών θερμοκρασιών, θέρμανσης, και οξειδωτικού στρες.

Ο σ^B έχει καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση ανθεκτικότητας σε όξινες συνθήκες. Φαινοτυπικά πειράματα έδειξαν ότι το στέλεχος *L. monocytogenes* $\Delta sigB$ είχε σημαντικά μικρότερη ικανότητα να επιβιώνει σε όξινες συνθήκες (pH 2.5) συγκριτικά με το άγριο στέλεχος (Wemekamp-Kamphuis et al., 2004, Chaturongakul & Boor, 2004, Chaturongakul et al., 2008). Ο παράγοντας σ^B επιδρά στην επαγωγή οξεοανθεκτικότητας μέσω ενεργοποίησης του συστήματος GAD το οποίο όπως προαναφέρθηκε, διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του *L. monocytogenes* σε περιβάλλον με χαμηλό pH όπως τα όξινα τρόφιμα (Cotter et al., 2001b) ή το γαστρικό υγρό (Cotter et al., 2001a, O'Byrne & Karatzas, 2008).

Όπως αναφέρεται και από τους Ferreira et al., (2003), ο παράγοντας σ^B παίζει σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα στην όξινη καταπόνηση, ATR του *L. monocytogenes* αφού το ποσοστό επιβίωσης των $\Delta sigB$ κυττάρων ήταν μικρότερο από το άγριο στέλεχος σε συνθήκες έντονης όξινης καταπόνησης με τεχνητό γαστρικό υγρό (pH 2.5) , αφού όμως είχε προηγηθεί προσαρμογή σε ήπιες όξινες συνθήκες (pH 4.5). Ωστόσο η ATR δεν εξασθενεί τελείως στα στελέχη που έχει αδρανοποιηθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί στον παράγοντα σ^B , υποδεικνύοντας ότι μπορεί να εμπλέκονται και άλλοι ρυθμιστικοί μηχανισμοί στην επαγωγή οξεοανθεκτικότητας (Ferreira et al., 2003). Αναφέρεται ακόμη από τους Makariti et al., (2015) ότι οι μικρότερες πληθυσμιακές μειώσεις και τα μεγαλύτερα D-values αντιστοιχούν στις περιπτώσεις που έγινε προσαρμογή σε ήπιες όξινες (pH \geq 5.2) και ωσμωτικές (NaCl \leq 4% w/v) συνθήκες και ακολουθούνται με υπερέκφραση του *sigB* καθώς και του *gad2*. Επιπρόσθετα οι Wiedmann et al. (1998) αναφέρουν σε μελέτη τους ότι το στέλεχος $\Delta sigB$ έδειξε χαμηλότερη ανθεκτικότητα στη στατική φάση ανάπτυξης από ότι το άγριο στέλεχος και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η επιβίωση στο όξινο περιβάλλον εξαρτάται από την έκφραση πρωτεϊνών που εξαρτώνται από τον σ^B .

1.5. Επιβίωση του *L. monocytogenes* σε συνθήκες ωσμωτικής καταπόνησης

Ένας συχνά χρησιμοποιούμενος τρόπος συντήρησης τροφίμων είναι η μείωση της ενεργότητας νερού, η ξήρανση ή η προσθήκη ωσμωτικά ενεργών ουσιών όπως αλάτι και σάκχαρα που μειώνουν την ενεργότητα νερού του τροφίμου (Abee & Wouters 1999). Τα βακτηριακά κύτταρα χρειάζεται να διατηρούν την ενδοκυτταρική ωσμωτική πίεση μεγαλύτερη από αυτή του περιβάλλοντος προκειμένου να διατηρήσουν την πίεση σπαργής, που είναι η κινητήριος δύναμη για την ανάπτυξη, διαίρεση και την κυτταρική επιμήκυνση (Brown, 1976, Taiz, 1984, Csonka, 1989, Hill et al., 2002). Η ικανότητά του μικροοργανισμού να προσαρμόζεται σε ωσμωτικές αλλαγές του περιβάλλοντος είναι πολύ σημαντική για την ανάπτυξη και την επιβίωση του. Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* διαθέτει μηχανισμούς ωσμωανθεκτικότητας για να αντιμετωπίσει τις διακυμάνσεις της ενεργότητας νερού στο περιβάλλον (Galinski, 1995, Hill et al., 2002).

Η απόκριση στην προσωρινή απώλεια της σπαργής που ακολουθείται από το ωσμωτικό σοκ είναι η κυτταροπλασματική συσσώρευση συγκεκριμένων διαλυμένων ουσιών που δεν παρεμβαίνουν σημαντικά στη λειτουργία των ενδοκυτταρικών ενζύμων. Αυτές οι ουσίες είναι μικρά οργανικά μόρια οι οποίες έχουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά: είναι διαλυτές σε υψηλές συγκεντρώσεις και μπορεί να συσσωρεύονται σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων που έχουν υποστεί ωσμωτική καταπόνηση. Ειδικά συστήματα μεταφοράς που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη επιτρέπουν την ελεγχόμενη συσσώρευση αυτών των ουσιών και δεν επηρεάζουν τη λειτουργικότητα των ενζύμων αλλά δρουν προστατευτικά ως προς τη μετουσίωση τους από τα άλατα ή από την ξήρανσή και την ψύξη (Abee & Wouters 1999).

Οι Bayles και Wilkinson (2000) έδειξαν ότι η γλυκίνη-βεταΐνη, προλίνη-βεταΐνη, ακετυλο-καρνιτίνη, καρνιτίνη, Υ-βουτυροβεταΐνη και το 3-δυμεθυλοσουλφοπροπιονικό λειτουργούν ως ωσμωπροστατευτικά στον *L. monocytogenes*. Η παρουσία αυτών των παραγόντων είχε σαν αποτέλεσμα αύξηση στον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων που είχαν υποστεί καταπόνηση παρουσία άλατος συγκριτικά με τα καταπονημένα κύτταρα

χωρίς ωσμωπροστατευτικά. Τα κύτταρα προσλαμβάνουν ωσμωλύτες από το εξωτερικό περιβάλλον σαν απόκριση στην ωσμωτική καταπόνηση, το οποίο τα βοηθά να αποκαταστήσουν την ωσμωτική ισορροπία μέσα στο κύτταρο (Bayles and Wilkinson 2000, Gandhi & Chikindas 2007).

Δύο μεταφορείς είναι υπεύθυνοι για την πρόσληψη βεταΐνης οι BetL and Gbu (Ko and Smith, 1999, Sleator et al., 1999). Τα στελέχη που είχαν απενεργοποιημένο το γονίδιο που κωδικοποιεί τον BetP είχαν περιορισμένη ανάπτυξη σε συνθετικό θρεπτικό μέσο με αυξημένη ωσμωτικότητα. (Sleator et al., 1999). Ο Gbu είναι ένας ATP-εξαρτώμενος μεταφορέας βηταΐνης που αποτελείται από τρεις διακριτές υπομονάδες GbuA, GbuB, και GbuC. Τα στελέχη που τους είχε αφαιρεθεί αυτό το σύστημα μεταφοράς δεν ήταν ικανά να χρησιμοποιήσουν αποτελεσματικά τη βηταΐνη σαν ωσμωπροστατευτικό (Ko and Smith, 1999). Η μεταφορά της καρνιτίνης συμβαίνει κυρίως μέσω της δραστηριότητας του OpuC, άλλου ATP-εξαρτώμενου μεταφορέα που ανήκει στην πρωτεΐνοεξαρτώμενη υποομάδα πρόσδεσης των ABC μεταφορέων (Fraser et al. 2000, 2003). Ο μεταφορέας OpuC κωδικοποιείται από ένα οπερόνιο τεσσάρων γονιδίων, των *opuCA*, *opuCB*, *opuCC*, και *opuCD*. (Fraser et al. 2000). Τα στελέχη που δεν είχαν το γονίδιο *OpuC* ήταν μη αποτελεσματικά στο να προσλαμβάνουν την καρνιτίνη (Fraser et al., 2000) αλλά παρατηρήθηκε μια περιορισμένη μεταφορά καρνιτίνης που υποδεικνύοντας ότι υπάρχουν και εναλλακτικά μονοπάτια για τη μεταφορά αυτής της ουσίας. (Fraser and O' Byrne, 2002, Sleator et al. 2001).

Σε γονιδιακό επίπεδο, οι Duche et al., (2002) μελέτησαν την έκφραση πρωτεϊνών μετά από καταπόνηση παρουσία άλατος χρησιμοποιώντας 2-D gel ηλεκτροφόρησης. Ανάμεσα στις πρωτεΐνες που εντοπιστήκαν, βρέθηκαν ορισμένες όμοιες με δύο ομάδες πρωτεϊνών που εκφράζονται σε συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών, τις πρωτεΐνες καταπόνησης υπό συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας (Csp, cold shock proteins και Cap, cold acclimation proteins) (Bayles et al., 1996, Gandhi & Chikindas, 2007). Οι Duche et al., (2002) εντόπισαν τις πρωτεΐνες ωσμωτικής καταπόνησης (salt shock proteins, Ssp) που η έκφραση τους επάγεται ταχύτατα αλλά υπερεκφράζονται για σύντομο χρονικό διάστημα και τις πρωτεΐνες προσαρμογής στην καταπόνηση (stress acclimation proteins, Sap) που

η έκφραση τους επάγεται ταχύτατα αλλά συνεχίζουν να υπερεκφράζονται για σύντομο χρονικό διάστημα, αφού οι συνθήκες γίνουν πάλι ευνοϊκές. Ανάμεσα στις έντεκα Saps που ταυτοποιήθηκαν, είναι η *GbuA*, που λειτουργεί ως ωσμοπροστατευτικός μεταφορέας για τη γλυκίνη-βεταΐνη (Duche et al., 2002, Gandhi & Chikindas, 2007).

1.5.1. Ρόλος του παράγοντα σ^B σε συνθήκες ωσμωτικής καταπόνησης

Η μεταγραφή των οπερονίων *gbu*, *betL*, και *oruC* είναι γνωστό ότι επάγεται κατά το ωσμωτικό σοκ (Cetin et al., 2004, Fraser et al., 2003, Sleator et al., 2003) και η έκφραση των ωσμωλυτικών μεταφορέων πρωτεϊνών *Gbu* και *Oru* είναι εξαρτώμενη από τη δράση του σ^B (Cetin et al., 2004, Fraser et al., 2003, Soni et al., 2011). Τα στελέχη που είχαν απενεργοποιημένο το γονίδιο του σ^B είχαν μειωμένη ικανότητα συσσώρευσης γλυκίνης-βεταΐνης και ωσμωλυτών καρνιτίνης. (Becker et al., 1998, 2000, Soni et al., 2011). Εκκινητές των παραγόντων σ^B βρέθηκαν πριν το γονίδιο *oruCA* (Fraser et al., 2000, Sleator et al., 1999), αλλά δεν βρέθηκαν πριν το γονίδιο *gbuA* (Ko and Smith, 1999). Συνεπώς η μεταγραφή του *oruCA* επιβεβαιώθηκε ότι εξαρτάται από τον παράγοντα σ^B (Fraser et al., 2003, Sue et al., 2003) και ένας εκκινητής σ^B εντοπίστηκε σε 58 bp ανωφερικά του γονιδίου *oruCA* (Kazmierczak et al., 2003). Ο ρόλος του σ^B στη μεταγραφή των *betL* και *gbuA* δεν έχει διαλευκανθεί ακόμα καθώς η ωσμωτική επαγωγή του *gbuA* στο *L. monocytogenes* 10403S συνέβη ακόμα και στα στελέχη που δεν είχαν τον παράγοντα σ^B (Fraser et al., 2003). Ωστόσο στο ίδιο στέλεχος οι Cetin et al. (2004) εντόπισαν δύο εκκινητές πριν το γονίδιο *gbuA* και επιβεβαίωσαν ότι ο ένας από αυτούς είναι εξαρτώμενος από τον σ^B (Cetin et al., 2004, Fraser et al., 2003).

1.6. Στοχαστικότητα

Η παραλλακτικότητα είναι χαρακτηριστικό των βιολογικών φαινομένων καθώς τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται μέσα σε έναν πληθυσμό. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, η ατομική συμπεριφορά των κυττάρων αποτελεί ένα στοχαστικό φαινόμενο, το οποίο δεν αποτελεί απόρροια επίδρασης του περιβάλλοντος ή του ιστορικού τους.

Είναι γνωστό ότι τα βακτήρια αντιδρούν στο δυσμενές περιβάλλον επάγοντας την έκφραση γονιδίων ανθεκτικότητας. Η στοχαστικότητα περιγράφει την τάση των βακτηρίων να αναπτύσσουν διαφορετικά είδη συμπεριφοράς για να «προβλέπουν» και να ανταποκρίνονται στις πιθανές δυσμενείς αλλαγές στο περιβάλλον στα πλαίσια της απόκρισης τους σε καταπονήσεις (Losick & Desplan 2008).

Ο Withell (1942) είχε υποδείξει ότι η σχέση μεταξύ μικροβιακής απόκρισης και καταπόνησης δεν μπορεί να χαρακτηριστεί από ομοιογένεια στον μικροβιακό πληθυσμό αλλά μπορεί να χαρακτηριστεί από μια κατανομή ευαισθητοποίησης στην καταπόνηση που δηλώνει τους διαφορικούς χρόνους απώλειας βιωσιμότητας. Αυτό δείχνει την ύπαρξη ανθεκτικών στις καταπονήσεις υποπληθυσμών, ένα χαρακτηριστικό ιδιαίτερα σημαντικό για την ικανότητα των μικροοργανισμών να αναπτύσσονται σε μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα, γεγονός που αποτελεί δυνητικό κίνδυνο για την ασφάλεια των τροφίμων, καθώς μπορεί να οδηγήσει σε παρουσία υψηλότερων βακτηριακών πληθυσμών από αυτούς που αναμένονται να ανασταλούν με τις κοινές πρακτικές συντήρησης των τροφίμων και ιδιαίτερα όσον αφορά στις ήπιες μεθόδους συντήρησης. Επιπλέον, αυτοί οι πληθυσμοί μπορούν να γίνουν μέρος της τοπικής χλωρίδας και να προκληθεί διασταυρούμενη επιμόλυνση στο περιβάλλον της επεξεργασίας τροφίμων, με συνέπεια την πιθανή επαναμόλυνση του τελικού προϊόντος

Η κατανόηση της παραλλακτικότητας στη λειτουργία μηχανισμών γονιδιακής ρύθμισης κατά τη διαδικασία της μεταγραφής είναι σημαντική, όντας η κύρια πηγή της

φαινοτυπικής ετερογένειας (Kiviet et al. 2014). Η παρουσία πρωτεϊνών αντιμετώπισης μιας καταπόνησης είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη ικανότητας επιβίωσης σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων. Η κατανομή της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών αυτών μπορεί να περιγράψει την πορεία μιας καμπύλης απενεργοποίησης στην απόκριση έναντι της εκάστοτε καταπόνησης. Συνεπώς, το ποσοστό του πληθυσμού που επιβιώνει μιας καταπόνησης αντικατοπτρίζει την ετερογένεια στην έκφραση πρωτεϊνών καταπόνησης που συμβαίνει σε κάθε κύτταρο υπο τις ίδιες συνθήκες καταπόνησης (Booth, 2002).

Τα βιοχημικά μονοπάτια (μεταγωγές απόκρισης) που ενεργοποιούνται κατά την απόκριση του οργανισμού έναντι πιθανών αλλαγών του περιβάλλοντος και οι μοριακοί μηχανισμοί που τα διέπουν, συμμετέχουν στην αντιστάθμιση των περιβαλλοντικών συνθηκών μέχρι ένα βαθμό. Η αυθόρμητη εισαγωγή ή έξοδος από μια φυσιολογική κατάσταση ονομάζεται *στοχαστική μεταγωγή* (stochastic switching) (Johnston & Desplan 2010, Veening et al. 2008).

Στις συμβατικές πειραματικές προσεγγίσεις υπολογίζονται μέσες πληθυσμιακές τιμές η μέσες τιμές μιας παραμέτρου που χαρακτηρίζει την απόκριση του πληθυσμού. Με αυτό τον τρόπο η διακυτταρική παραλλακτικότητα καλύπτεται, αφού στην πραγματικότητα η απόκριση πληθυσμού κατανέμεται σε ένα εύρος τιμών διότι περιλαμβάνει υποπληθυσμούς με διαφορετική ικανότητα απόκρισης. Στα πλαίσια της προσπάθειας να περιγράψει η μικροβιακή συμπεριφορά γεννήθηκε η ανάγκη να περιγραφεί η απόκριση των μικροοργανισμών στοχαστικά. Τα στοχαστικά μοντέλα αναγνωρίζουν και λαμβάνουν υπόψιν την τυχαιότητα και την παραλλακτικότητα σε ένα πειραματικό σύστημα (McKellar & Lu, 2003) και κάθε μεταβλητή μπορεί να περιγράψει από κατανομές. Συνεπώς η στοχαστική προσέγγιση δίνει την δυνατότητα πιο ολοκληρωμένης κατανόησης των βιολογικών φαινομένων.

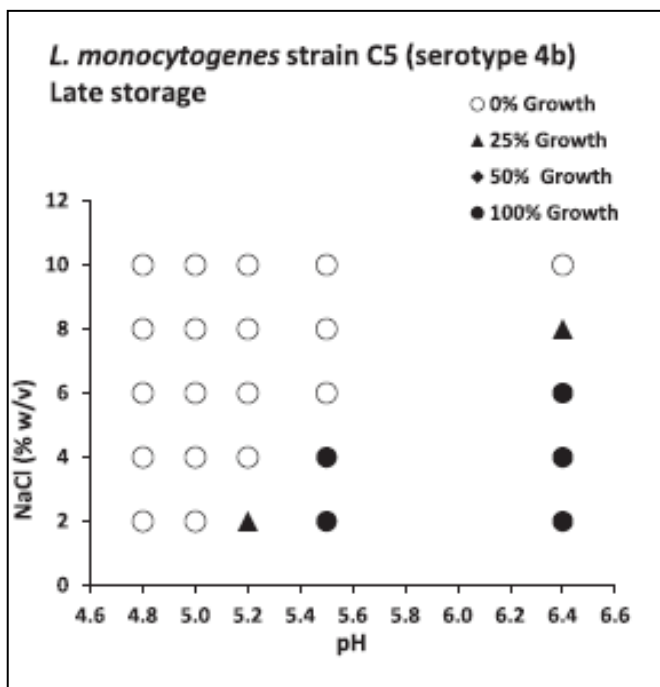
Οι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την βακτηριακή απόκριση ποικίλουν. Η υποβολή ενός μικροβιακού πληθυσμού σε έντονη καταπόνησης έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση παραλλακτικότητας στην απόκρισή του, δηλαδή τη φαινοτυπική, αλλά όχι γονοτυπική διαφοροποίησή του (McKellar & Lu, 2003). Παραδείγματα εμφάνισης

παραλλακτικότητας έχουν παρατηρηθεί σε περιπτώσεις θερμικής και μη-θερμικής απενεργοποίησης υπό δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, όπου η μορφή της καμπύλης θανάτωσης υποδεικνύει την ετερογένεια στην απόκριση που προκύπτει από την έντονη καταπόνηση. Η μορφή των κινητικών καμπυλών επιβίωσης (απενεργοποίησης) ενός βακτηρίου έναντι ακραίας καταπόνησης εξαρτάται από τη φυσιολογία του βακτηρίου, τη φάση ανάπτυξης στην οποία βρίσκεται, αλλά και από την πιθανή προηγούμενη έκθεσή του σε συνθήκες που επάγουν προσαρμοστικούς μηχανισμούς (έναντι της ακόλουθης καταπόνησης) (Coroller et al., 2006). Δεν ακολουθεί κάθε κύτταρο του πληθυσμού την ίδια κινητική απενεργοποίησης. Για το λόγο αυτό, σύμφωνα με τους Aspridou & Koutsoumanis (2015), η κινητική απενεργοποίησης ενός μικτού μικροβιακού πληθυσμού (ο οποίος αποτελείται από διαφορετικής ανθεκτικότητας υποπληθυσμούς) μπορεί να περιγραφεί στοχαστικά.

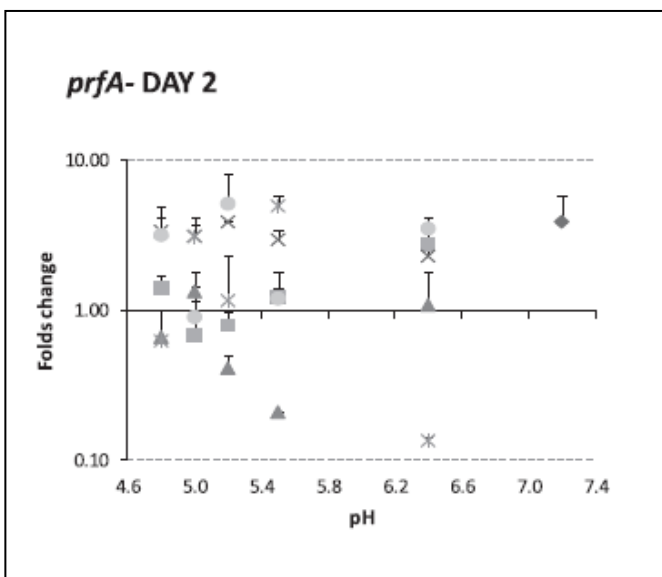
Παραλλακτικότητα έχει παρατηρηθεί και στην απόκριση των μικροοργανισμών κατά την έκθεσή τους σε υποθανάτιες συνθήκες. Όπως αναφέρεται σε μελέτη του Koutsoumanis (2008), κατά την παραμονή σε ήπιες συνθήκες ωσμωτικής και όξινης καταπόνησης, αναδεικνύεται η παρουσία δύο υποπληθυσμών *Salmonella enteritidis* με διαφορετικής διάρκειας φάση προσαρμογής. Μελετώντας την ικανότητα ανάπτυξης σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων οι Koutsoumanis & Lianou, (2015), αναφέρουν την εμφάνιση παραλλακτικότητας τόσο στον χρόνο προσαρμογής (lag-time) όσο και στο ρυθμό αύξησης πληθυσμών που προέρχονται από μεμονωμένα κύτταρα. Παραλλακτικότητα στην ικανότητα ανάπτυξης, σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων (1 έως 4 κύτταρα) αναφέρεται και από τους Manios et al., (2013) για την *L. monocytogenes* και *Salmonella Typhimurium* σε φρέσκο-κομμένες σαλάτες και στείρα υγρά και στερεοποιημένα εκχυλίσματα. Επιπρόσθετα, παραλλακτικότητα στον χρόνο προσαρμογής έχει παρατηρηθεί για τον *L. monocytogenes* κατά την παραμονή σε ήπιες όξινες, ωσμωτικές και θερμοκρασιακές καταπονήσεις (Guillier & Augustin, 2006).

1.7. Υπόθεση Εργασίας

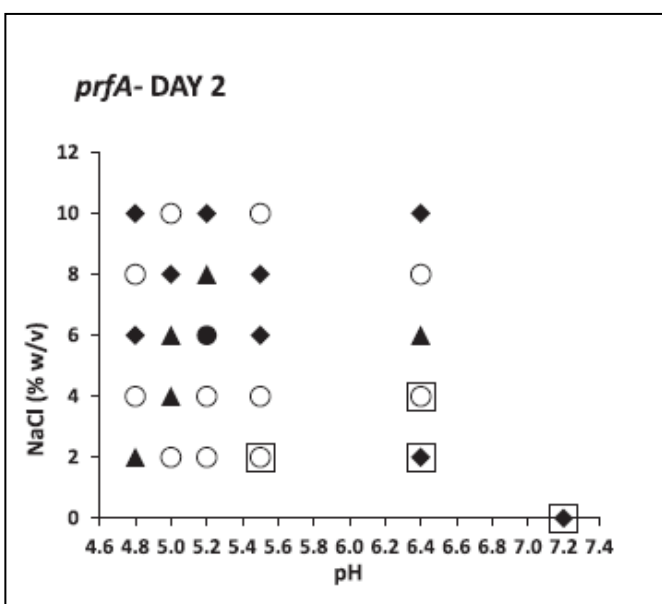
Σε προηγούμενη μελέτη των Makariti et al., (2015) παρατηρήθηκε ότι η παραμονή του *L. monocytogenes* σε ήπιες συνθήκες ωσμωτικής (2-10% w/V NaCl) και όξινης καταπόνησης (pH 4.8-6.4) σε θερμοκρασία 7°C επηρεάζει τη μετέπειτα ικανότητα επιβίωσης του παθογόνου σε έντονη όξινη καταπόνηση (pH 2.0). Η παραμονή σε υποθανάτιες συνθήκες (pH και NaCl) επηρέασε τα όρια μεταγραφής γονιδίων, σχετιζόμενων είτε με μηχανισμούς απόκρισης έναντι καταπονήσεων, είτε με τη λοιμοξιογόνο δράση του παθογόνου, τα οποία σε κάποιες περιπτώσεις δύνανται να συσχετιστούν με την αντίστοιχη επαγωγή οξεοανθεκτικότητας. Επιπλέον, στους συνδυασμούς pH και NaCl που βρίσκονται κοντά στα όρια ανάπτυξης-μη ανάπτυξης παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό του πληθυσμού που εμφανίζει ικανότητα ανάπτυξης παραλλάσσει (εντός των επαναλήψεων, n=4) (**Σχήμα 1.7**). Παραλλακτικότητα παρατηρήθηκε και σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης, όπως φαίνεται από τις υψηλές τυπικές αποκλίσεις, (**Σχήμα 1.8**) αλλά και το ποσοστό των επαναλήψεων (n=3) που παρουσιάζει αρνητική ή θετική ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής κυρίως κατά την παραμονή του παθογόνου σε οριακές για την ανάπτυξη συνθήκες (**Σχήμα 1.9**)



Σχήμα 1.7 Ικανότητα ανάπτυξης/μη ανάπτυξης του *L. monocytogenes* σε συνδυασμούς NaCl (%) και pH μετά από δύο ημέρες συντήρηση στους 7 °C. Τα κλειστά σχήματα υποδηλώνουν ανάπτυξη και τα ανοιχτά σχήματα τη μη ανάπτυξη. Τα σχήματα αντιστοιχούν στο ποσοστό των βιολογικών επαναλήψεων (n=4) που παρατηρήθηκε ανάπτυξη: (●) 100% ανάπτυξη, (◆) 50% ανάπτυξη, (▲) 25% ανάπτυξη, (○) 0% ανάπτυξη.



Σχήμα 1.8 Μεταβολές στη μεταγραφή του *prfA* μετά από έκθεση σε TSBYE διαφορετικών pH και (%) NaCl για δύο μέρες στους 7 °C. Τα σύμβολα αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις 0% (♦), 2% (■), 4% (▲), 6% (x), 8% (*) και 10% (●) . Με ράβδους σφάλματος απεικονίζονται οι τυπικές αποκλίσεις μεταξύ των επαναλήψεων (n=3).



Σχήμα 1.9 Θετική/Αρνητική ρύθμιση των ορίων του *prfA* του *L. monocytogenes* σε συνδυασμούς (%) NaCl και pH μετά από δύο ημέρες συντήρηση στους 7 °C. Η θετική και αρνητική ρύθμιση εκτιμήθηκε συγκριτικά με τις μεταβολές στην έκφραση που σημειώθηκαν σε pH 7.2, 0% w/v NaCl, τη μηδενική μέρα συντήρησης. Τα σχήματα αντιστοιχούν στο ποσοστό των βιολογικών επαναλήψεων (n=3) στα οποία παρατηρήθηκε θετική ρύθμιση : (●) 100% , (♦) 65% , (▲) 33%, (○) 0%.

Η εμφάνιση παραλλακτικότητας έχει μελετηθεί φαινοτυπικό όσο και σε γονιδιακό επίπεδο ως πηγή της φαινοτυπικής ετερογένειας (Kiviet et al. 2014, Raser & O’Shea, 2004). Η στοχαστικότητα στην ικανότητα ανάπτυξης του *L. monocytogenes* έχει παρατηρηθεί, όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο, σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων (Koutsoumanis & Lianou, 2013, Manios et al., 2013) αλλά και σε υψηλούς πληθυσμούς όταν βρίσκονται σε συνθήκες κοντά στα όρια ανάπτυξης/μη ανάπτυξης (Koutsoumanis, 2008, Francois et al., 2006). Επιπλέον, σε συνθήκες έντονης

καταπόνησης, κάθε κύτταρο ενός μικτού πληθυσμού έχει διαφορετικό δυναμικό επιβίωσης αντικατοπτριζόμενο από τη διαφορετική κινητική απενεργοποίησης των εκάστοτε υποπληθυσμών (Aspridou & Koutsoumanis, 2015).

Επομένως υποθέσαμε ότι δεδομένης της παρατηρούμενης παραλλακτικότητας στην ικανότητα ανάπτυξης του *L. monocytogenes* σε συνθήκες ήπιας καταπόνησης κοντά στα όρια ανάπτυξης/μη ανάπτυξης στην μεταβολή των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης, αλλά και στην οξεοανθεκτικότητα του παθογόνου έναντι ακραίας όξινης καταπόνησης καθιστά την απόκριση του παθογόνου στοχαστικό φαινόμενο.

Στόχος της παρούσης μελέτης ήταν η εκτίμηση της επίδρασης της παραλλακτικότητας σε επίπεδο βιολογικών και πειραματικών επαναλήψεων στη στοχαστική απόκριση του *L. monocytogenes* έναντι συνδυασμών pH και NaCl εκατέρωθεν των ορίων ανάπτυξης/ μη ανάπτυξης στους 7°C σε επίπεδο: (α) ανάπτυξης, (β) μετέπειτα οξεοανθεκτικότητας σε ακραία όξινη καταπόνηση και (γ) μεταγραφής γονιδίων σχετιζόμενων με αντιμετώπιση καταπονήσεων (*gad2*- glutamate decarboxylase 2, *sigB*-sigma B factor) και λοιμωξιολογίου δράσης (*prfA*- positive regulatory factor).

2. Υλικά Και Μέθοδοι

2.1 Στελέχη μικροοργανισμών

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* C₅ που ανήκει στη μικροβιακή συλλογή του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το στέλεχος C₅ ανήκει στον ορότυπο 4b και έχει απομονωθεί από περιβάλλον γαλακτοβιομηχανίας, ενώ στην παρούσα μελέτη κωδικοποιείται ως PL1.

2.2 Προετοιμασία εμβολίου

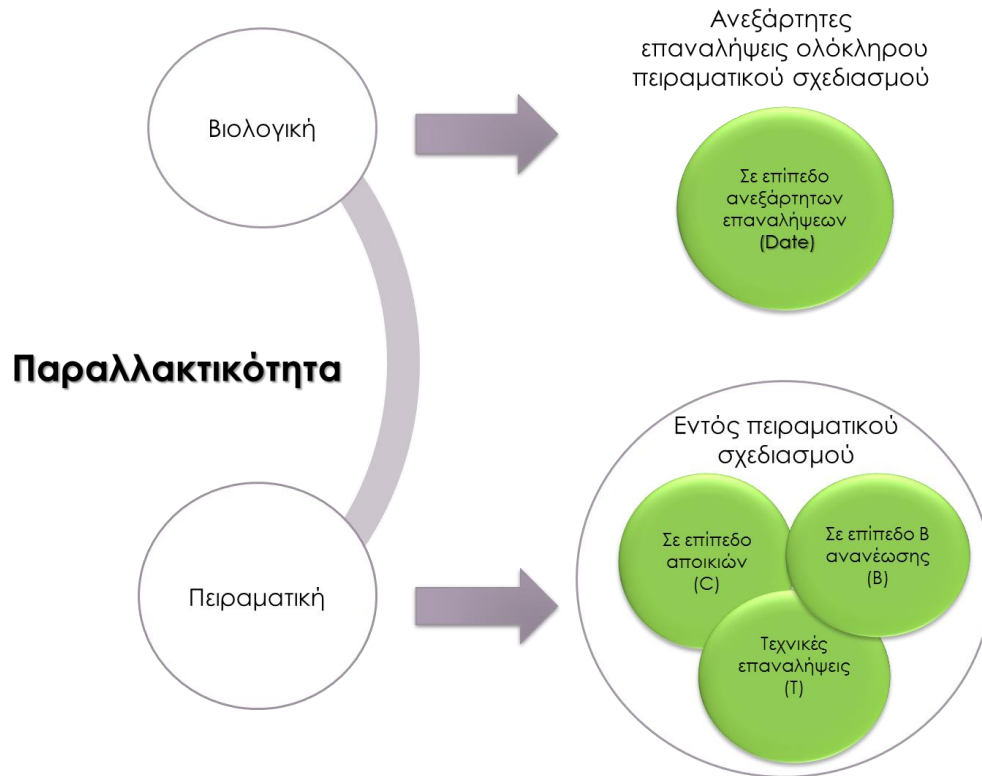
Το βακτηριακό στέλεχος ήταν αποθηκευμένο σε θρεπτικό υλικό Tryptone Broth με 0.6% w/w Yeast Extract (TSBYE) με 20% v/v γλυκερόλη στους -20°C. Για μικρού μήκους συντήρηση, πραγματοποιούταν γραμμική εξάπλωση (streaking) σε τρυβλία Tryptone Soy Agar με 0.6% w/v Yeast Extract (LabM, LAB011), μετά από δύο ανανεώσεις (24h και 18h αντίστοιχα) σε TSBYE. Τα τρυβλία φυλάσσονταν σε θερμοκρασία 4°C και χρησιμοποιούνταν έως τρεις εβδομάδες .

Για την προετοιμασία του εμβολίου, προηγείται η διαδικασία της ανανέωσης της καλλιέργειας του μικροοργανισμού και ακολουθεί ο καθαρισμός του εμβολίου. Η ανανέωση των μικροοργανισμών γίνεται προκειμένου οι μικροοργανισμοί να ανακτήσουν τη ζωτικότητα τους και να απαλοιφθεί η καταπόνηση που δημιουργείται κατά την παραμονή τους σε συνθήκες κατάψυξης ή ψύξης. Η ανανέωση περιλαμβάνει δύο ανακαλλιέργειες για 24 h και 18 h αντίστοιχα σε θερμοκρασία ιδανική για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Συγκεκριμένα, με τη βοήθεια βακτηριακού κρίκου, λαμβάνεται μονή βακτηριακή αποικία και υπό ασηπτικές συνθήκες μεταφέρεται σε 10mL αποστειρωμένο TSBYE. Ακολουθεί καλή ανάδευση σε αναδευτήρα Vortex και επώαση για 24h στους 30°C (Α' ανανέωση). Στη συνέχεια, όγκος 100μL από την πρώτη ανανέωση μεταφέρεται υπό ασηπτικές συνθήκες σε 10mL νέου αποστειρωμένου TSBYE. Ακολουθεί καλή ανάδευση σε αναδευτήρα Vortex και επώαση, για 18h στους 30°C (Β' ανανέωση).

Ο καθαρισμός του εμβολίου που ακολουθεί έχει σκοπό έχει την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και όλων των μικροβιακών προϊόντων μεταβολισμού που υφίστανται στο μέσο. Για τον καθαρισμό του εμβολίου η καλλιέργεια μεταφέρεται σε σωλήνα Falcon χωρητικότητας 15ml και ακολούθως φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία 4°C με ταχύτητα 3600 rpm για 10min. Ακολουθεί απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 10ml ¼ strength Ringer's solution. Το παραπάνω βήμα επαναλαμβάνεται δυο φορές και τελικά επαναδιαλύεται το ίζημα σε 10 ml ¼ Ringer's solution ώστε να επιτυγχάνεται η τελική συγκέντρωση του *L. monocytogenes* να είναι $10^{8.5}$ CFU/ml.

2.3 Εκτίμηση παραλλακτικότητας

Η παραλλακτικότητα εκτιμήθηκε τόσο μεταξύ διαφορετικών συνθηκών συντήρησης (pH και NaCl) και απόκρισης του μικροοργανισμού (ικανότητα ανάπτυξης, οξεοανθεκτικότητα, γονιδιακή έκφραση) σε κάθε πειραματικό στάδιο όσο και σε επίπεδο προέλευσης εμβολίου. Η εκτίμηση της πειραματικής παραλλακτικότητας περιελάμβανε χρήση εμβολίου του *L. monocytogenes* που προήλθε από α) από διαφορετικές αποικίες ($n \leq 15$) (C) β) ίδια αποικία και διαφορετικές B' ανανεώσεις ($n \leq 15$) (B) γ) ίδια αποικία και ίδια B' ανανέωση ($n \leq 15$) (T), ενώ ολόκληρη η πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές, σε τρεις διαφορετικές ημέρες ($n=3$) (dates) για την εκτίμηση της βιολογικής παραλλακτικότητας (**Σχήμα 2.1**)



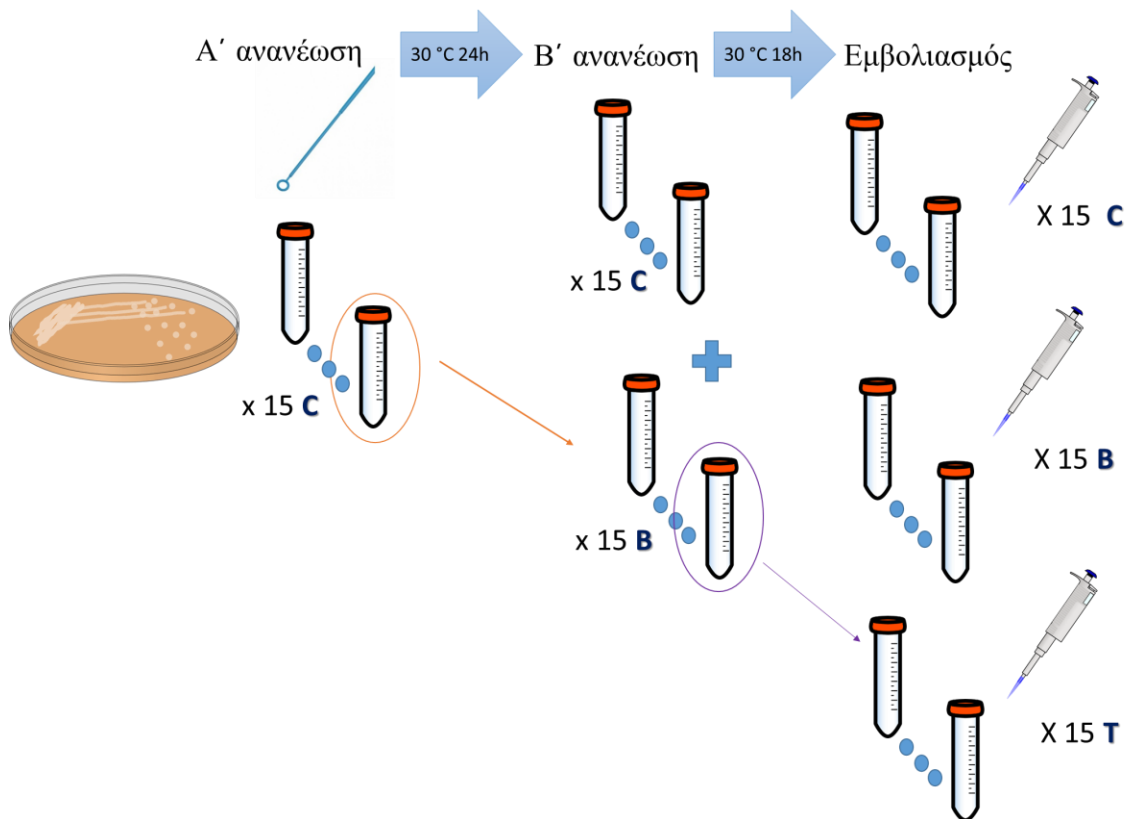
Σχήμα 2.1 Η παραλλακτικότητα μελετήθηκε σε επίπεδο πειραματικών και βιολογικών επαναλήψεων. Για την εκτίμηση της πειραματικής παραλλακτικότητας χρησιμοποιήθηκε εμβόλιο που προήλθε (C) από διαφορετικές **αποικίες** ($n \leq 15$), (B) από διαφορετικές **B' ανανεώσεις** ($n \leq 15$), (T) από αποικία και ίδια B' ανανέωση ($n \leq 15$), ενώ τρεις ($n=3$) ανεξάρτητες επαναλήψεις ολόκληρου του πειραματικού σχεδιασμού, σε **διαφορετικές ημέρες** (dates) χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της βιολογικής παραλλακτικότητας.

2.4 Εκτίμηση της παραλλακτικότητας στην ικανότητα ανάπτυξης του *L. monocytogenes* υπό την επίδραση υποθανάτιων συνδυασμών pH και NaCl.

2.4.1. Προετοιμασία εμβολίου και θρεπτικού υποστρώματος

Ως θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε TSBYE με ποικίλους συνδυασμούς pH και NaCl, ενώ η παραλλακτικότητα στην ανάπτυξη του *L. monocytogenes* μελετήθηκε σε επίπεδο βιολογικών και πειραματικών επαναλήψεων, στις οποίες συνεκτιμήθηκε ως παράγοντας παραλλακτικότητας και η προέλευση του εμβολίου. Πιο συγκεκριμένα, με σκοπό την εκτίμηση της πειραματικής παραλλακτικότητας χρησιμοποιήθηκε εμβόλιο

που προετοιμάστηκε από διαφορετικές αποικίες (n=15) (C), από ίδια αποικία και διαφορετικές B' ανανεώσεις (n=15) (B), από ίδια αποικία, ίδια B' ανανέωση (n=15) (T), ενώ διενεργήθηκαν τρεις (n=3) ανεξάρτητες επαναλήψεις ολόκληρου του πειραματικού σχεδιασμού, σε διαφορετικές ημέρες (dates) για τον προσδιορισμό της βιολογικής παραλλακτικότητας (Σχήμα 2.2).

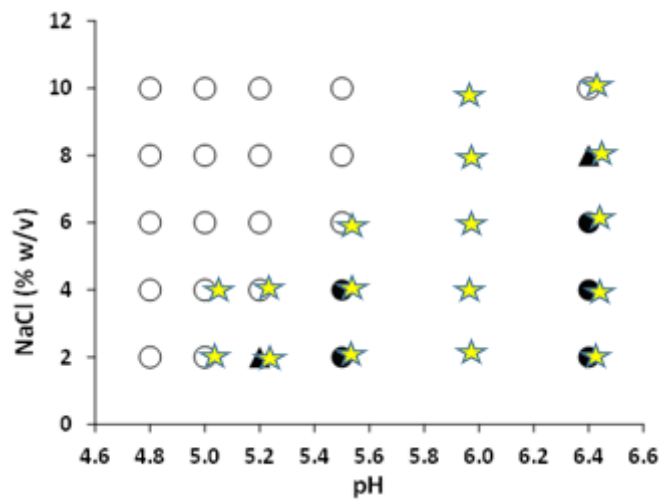


Σχήμα 2.2. Διαδικασία παραλαβής εμβολίου *L. monocytogenes*. Αρχικά γίνονται 15 A' ανανεώσεις από διαφορετικές μεμονωμένες αποικίες. Στη συνέχεια από κάθε μία A' ανανέωση γίνονται 15 B' ανανεώσεις (C) και από μία μόνο A' ανανέωση πραγματοποιούνται ακόμη 15 B' ανανεώσεις (B). Κατά την ημέρα του εμβολιασμού χρησιμοποιούνται οι 15 B' ανανεώσεις (C και B), ενώ μία B' ανανέωση χρησιμοποιήθηκε και για 15 επαναλήψεις τις διαδικασίας του εμβολιασμού (T).

Το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα, TSBYE προετοιμάστηκε με πολλαπλούς συνδυασμούς pH (5.0-7.2) και άλατος (NaCl 0-8% w/v). Η ρύθμιση του pH γινόταν μετά την αποστείρωση με χρήση διαλύματος HCl συγκέντρωσης 6N. Επιλέχθηκαν οι συνδυασμοί pH και NaCl

εκατέρωθεν της περιοχής ανάπτυξης-μη ανάπτυξης του *L. monocytogenes* (7°C) σύμφωνα με τους Makariti et al. (2015) (Σχήμα 2.3). Ο εμβολιασμός των διαφορετικών θρεπτικών μέσων έγινε ώστε η τελική συγκέντρωση του παθογόνου να είναι 10^7 log CFU/mL και ακολούθησε συντήρηση στους 7°C για 24h.

Ο εμβολιασμός έγινε σε τριβλία μικροτιτλοδότησης 96 θέσεων (microplates) (Σχήμα 2.4) που περιείχαν 270 μ L θρεπτικό υπόστρωμα, TSBYE pH (4.8-6.4), NaCl (2-8% w/v) και ως συνθήκη μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε TSBYE pH 7.2. Η τελική συγκέντρωση του παθογόνου ήταν 10^7 log CFU/ml.



Σχήμα 2.3 Διάγραμμα ανάπτυξης/μη ανάπτυξης του *L. monocytogenes* σε συνδυασμούς NaCl (% w/v) και pH μετά από δύο ημέρες συντήρησης στους 7 °C Makariti et al. (2015). Τα κλειστά σχήματα υποδηλώνουν ανάπτυξη και τα ανοιχτά σχήματα τη μη ανάπτυξη. Τα σχήματα αντιστοιχούν στο ποσοστό των επαναλήψεων (n=4) που παρατηρήθηκε ανάπτυξη: (●) 100% ανάπτυξη, (◆) 50% ανάπτυξη, (▲) 25% ανάπτυξη, (○) 0% ανάπτυξη. Με αστερίσκο συμβολίζονται οι συνδυασμένες συνθήκες που επιλέχθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Ακολουθούσε επώαση των τριβλίων μικροτιτλοδότησης στους 7°C για 20 ημέρες, ενώ η παρακολούθηση της ανάπτυξης του παθογόνου πραγματοποιούνταν με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 620nm 2 φορές/ημέρα καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης (20 ημέρες), σε ELISA reader sunrise-tecan. (Σχήμα 2.4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C1	C9	B1	B9	T1	T9	C1	C9	B1	B9	T1	T9
B	C2	C10	B2	B10	T2	T10	C2	C10	B2	B10	T2	T10
C	C3	C11	B3	B11	T3	T11	C3	C11	B3	B11	T3	T11
D	C4	C12	B4	B12	T4	T12	C4	C12	B4	B12	T4	T12
E	C5	C13	B5	B13	T5	T13	C5	C13	B5	B13	T5	T13
F	C6	C14	B6	B14	T6	T14	C6	C14	B6	B14	T6	T14
G	C7	C15	B7	B15	T7	T15	C7	C15	B7	B15	T7	T15
H	C8	B	B8	B	T8	B	C8	B	B8	B	T8	B

● Blank

Σχήμα 2.4 Τριβλία μικροτιτλοδότησης. Τα C1-C15 αντιπροσωπεύουν τις περιπτώσεις, όπου το εμβόλιο προήλθε από διαφορετικές αποικίες (C), τα B1-B15 τις περιπτώσεις που το εμβόλιο προήλθε από διαφορετικές B' ανανεώσεις μίας αποικίας (B), τα T1-T15 αντιπροσωπεύουν τις τεχνικές επαναλήψεις του εμβολιασμού (και έχουν προέλθει από ίδια B' ανανέωση μεμονωμένης αποικίας (T). Τα τριβλία μικροτιτλοδότησης που χρησιμοποιήθηκαν είναι 96 θέσεων και σε κάθε ένα οι σειρές 1 έως 6 και 7 έως 12 περιείχαν δύο διαφορετικούς συνδυασμούς TSBYE pH (5.0-7.2), NaCl (0-10% w/V).

2.4.2. Εκτίμηση ικανότητας ανάπτυξης

Οι τιμές της οπτικής πυκνότητας που παραλαμβάνονταν, διορθώνονταν με αφαίρεση της οπτικής πυκνότητας του ανεμβολίαστου θρεπτικού μέσου. Οι διορθωμένες τιμές οπτικής πυκνότητας χρησιμοποιούνταν για την κατασκευή των καμπυλών ανάπτυξης του παθογόνου. Ως γενικό κριτήριο ανάπτυξης βάσει της οπτικής πυκνότητας

χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο $OD \geq 0.2$ (Biesta-Peters et al. 2012, Mytilinaios et al., 2012). Ως μέτρο της ανάπτυξης για τη μέλετη της επίδρασης των διαφορετικών συνδυασμών pH και NaCl στην αύξηση του παθογόνου, εκτιμήθηκαν τα ακόλουθα:

A) ο ρυθμός ανάπτυξης (growth rate, g.r.)

B) η διάρκεια της φάσης προσαρμογής (lag time)

μέσω προσαρμογής των δεδομένων της οπτικής πυκνότητας σε καμπύλες ανάπτυξης μέσω του λογισμικού DMFit (Baranyi & Roberts 1994).

Γ) το εμβαδόν υπο της καμπύλης ανάπτυξης. Ως όριο ανάπτυξης ορίστηκε η τιμή 60 που αντιστοιχεί στο γενικό κριτήριο $OD \geq 0.2$

2.4.3 Εκτίμηση παραλλακτικότητας παραμέτρων ανάπτυξης

Ως δείκτες υπολογισμού της παραλλακτικότητας για τις παραμέτρους ανάπτυξης (g.r., lag time και areas) χρησιμοποιήθηκε :

α) ο συντελεστής μεταβλητότητας (Coefficient of Variation- %CV)

$$CV(\%) = \frac{\text{τυπική απόκλιση}}{\text{Μεση τιμή}} \cdot 100 = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

β) η Ρίζα του Μέσου Τετραγώνου του Σφάλματος (Root Mean Squared Error— RMSE), η οποία αποτελεί τον λόγο του αθροίσματος των τετραγώνων των καταλοίπων (RSS, Residual sum of Squares) προς τους βαθμούς ελευθερίας (DF, Degrees of freedom).

$$RMSE = \sqrt{\frac{RSS}{DF}}$$

Η βιολογική, η συνολική πειραματική παραλλακτικότητα και πειραματική ανά επίπεδο εμβολίου παραλλακτικότητα εκτιμήθηκε με τις παρακάτω εξισώσεις σύμφωνα με τους Argyani et al. (2015).

Βιολογική παραλλακτικότητα

$$RMSE = \sqrt{\frac{RSS}{DF}} = \sqrt{\frac{\sum_{B=1}^3 (\overline{X_{BCT}} - \overline{X_{Date}})^2}{n - p}}$$

Όπου

$\overline{X_{BCT}}$: ο μέσος όρος του εκάστοτε μέτρου ανάπτυξης (ρυθμός ανάπτυξης, χρόνος προσαρμογής, εμβαδόν) όλων των πειραματικών επαναλήψεων εντός μίας βιολογικής επανάληψης

$\overline{X_{DATE}}$: ο μέσος όρος του εκάστοτε μέτρου ανάπτυξης (ρυθμός ανάπτυξης, χρόνος προσαρμογής, εμβαδόν) όλων των βιολογικών επαναλήψεων (δηλαδή των ανεξάρτητων επαναλήψεων του πειράματος σε διαφορετικές ημερομηνίες)

DF : Βαθμοί ελευθερίας όπου n αριθμός των παραμέτρων και p αριθμός των παραγόντων που επιδρούν στην παραλλακτικότητα πχ στην περίπτωση αυτή διεξάχθηκαν 3 βιολογικές επαναλήψεις, άρα n=3 και p=1

Πειραματική παραλλακτικότητα

$$RMSE = \sqrt{\frac{RSS}{DF}} = \sqrt{\frac{\sum_{B=1}^3 \sum_{E=1}^{45} (x - \overline{X_{BCT}})^2}{n - p}}$$

x : κάθε παρατήρηση του εκάστοτε μέτρου ανάπτυξης

$\overline{X_{BCT}}$: ο μέσος όρος του εκάστοτε μέτρου ανάπτυξης (ρυθμός ανάπτυξης, χρόνος προσαρμογής, εμβαδόν) όλων των πειραματικών επαναλήψεων εντός μίας βιολογικής επανάληψης

DF : Βαθμοί ελευθερίας όπου n αριθμός των παραμέτρων και p αριθμός των παραγόντων που επιδρούν στην παραλλακτικότητα πχ στην περίπτωση των παραμέτρων ανάπτυξης όπου B=15, T=15, C=15 και Dates=3, n=135 και p=3

Πειραματική παραλλακτικότητα για B, C, T, ανεξάρτητα

$$RMSE \mathbf{B} = \sqrt{\frac{RSS}{DF}} = \sqrt{\frac{\sum_{B=1}^3 \sum_{E=1}^{45} (x - \bar{X}_B)^2}{n - p}}$$

$$RMSE \mathbf{C} = \sqrt{\frac{RSS}{DF}} = \sqrt{\frac{\sum_{B=1}^3 \sum_{E=1}^{45} (x - \bar{X}_C)^2}{n - p}}$$

$$RMSE \mathbf{T} = \sqrt{\frac{RSS}{DF}} = \sqrt{\frac{\sum_{B=1}^3 \sum_{E=1}^{45} (x - \bar{X}_T)^2}{n - p}}$$

x : κάθε παρατήρηση του εκάστοτε μέτρου ανάπτυξης

X_B, X_C, X_T : ο μέσος όρος του εκάστοτε μέτρου ανάπτυξης (ρυθμός ανάπτυξης, χρόνος προσαρμογής, εμβαδόν) όλων των πειραματικών επαναλήψεων του B, C ή T , αντίστοιχα, εντός μίας βιολογικής επανάληψης για τις παρατηρήσεις.

DF : Βαθμοί ελευθερίας όπου n αριθμός των παραμέτρων και p αριθμός των παραγόντων που επιδρούν στην παραλλακτικότητα πχ στην περίπτωση των παραμέτρων ανάπτυξης όπου B=15, T=15, C=15 και Dates=3. n=45 και p=3

και

Σ_B άθροισμα των βιολογικών επαναλήψεων

Σ_E άθροισμα πειραματικών επαναλήψεων

2.5 Εκτίμηση της επίδρασης υποθανάτιων συνδυασμών pH και NaCl στην παραλλακτικότητα της οξεοανθεκτικότητας του *L. monocytogenes*.

Σκοπός του πειράματος αυτού ήταν η μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συνδυασμών pH και NaCl εκατέρωθεν της περιοχής ανάπτυξης/ μη ανάπτυξης στην παραλλακτικότητα (πειραματική και βιολογική) της μετέπειτα οξεοανθεκτικότητας του *L. monocytogenes* έναντι ακραίου pH.

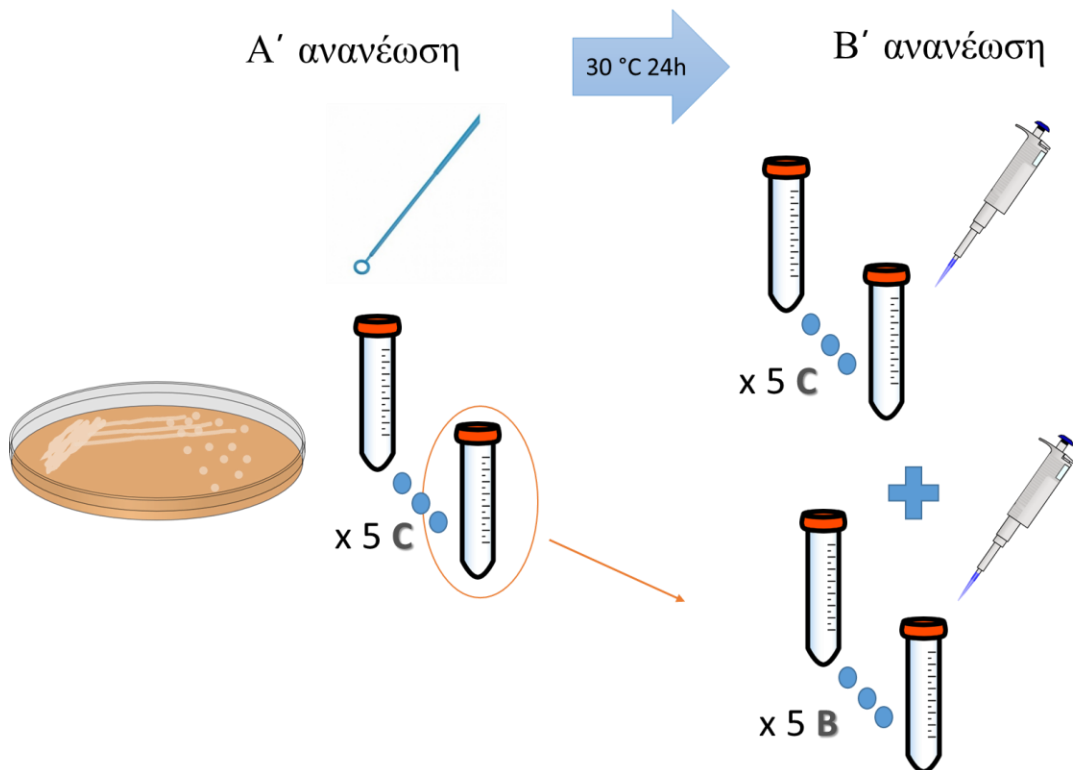
2.5.1. Προετοιμασία εμβολίου και θρεπτικού υποστρώματος

Για την εκτίμηση τόσο της πειραματικής όσο και της βιολογικής παραλλακτικότητας χρησιμοποιήθηκε *L. monocytogenes* που προήλθε από (Σχήμα 2.5):

1) διαφορετικές αποκίες (C) -πειραματική επανάληψη (n=5)

2) ίδια αποκία και διαφορετικές B' ανανεώσεις (B) -πειραματική επανάληψη (n=5)

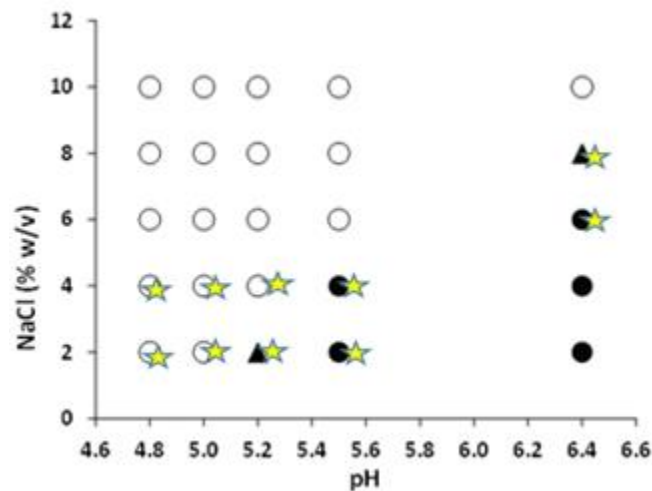
Ενώ έγιναν τρεις (3) ανεξάρτητες επαναλήψεις (βιολογική επανάληψη- dates), σε διαφορετικές ημέρες, ολόκληρου του πειραματικού σχεδιασμού (n=3)



Σχήμα 2.5 Διαδικασία παραλαβής εμβολίου *L. monocytogenes*. Αρχικά γίνονται 5 Α' ανανεώσεις από διαφορετικές μεμονωμένες αποκίες. Στη συνέχεια από κάθε μία Α' ανανέωση γίνονται 5 Β' ανανεώσεις (C) και από μία μόνο Α' ανανέωση πραγματοποιούνται ακόμη 5 Β' ανανεώσεις (B). Κατά την ημέρα του εμβολιασμού χρησιμοποιούνται οι 5 Β' ανανεώσεις (C και B).

Το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα, TSBYE προετοιμάστηκε με πολλαπλούς συνδυασμούς pH (4.8-7.2) και άλατος (NaCl 0-8% w/v). Η ρύθμιση του pH γινόταν μετά την αποστείρωση

με χρήση διαλύματος HCl συγκέντρωσης 6N. Επιλέχθηκαν οι συνδυασμοί pH και NaCl εκατέρωθεν της περιοχής ανάπτυξης-μη ανάπτυξης του *L. monocytogenes* (7°C) σύμφωνα με τους Makariti et al. (2015) (Σχήμα 2.6) και ως συνθήκη μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε TSBYE pH 7.2. Ο εμβολιασμός των διαφορετικών θρεπτικών μέσων έγινε ώστε η τελική συγκέντρωση του παθογόνου να είναι 10^7 log CFU/mL και ακολούθησε συντήρηση στους 7°C για 24h.



Σχήμα 2.6 Απεικόνιση της ικανότητας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης του *L. monocytogenes* σε συνδυασμούς NaCl (% w/V) και pH μετά από δύο ημέρες συντήρηση στους 7°C (Makariti et al., 2015). Τα κλειστά σχήματα υποδηλώνουν ανάπτυξη και τα ανοιχτά σχήματα τη μη ανάπτυξη. Τα σχήματα αντιστοιχούν στο ποσοστό των βιολογικών επαναλήψεων (n=4) που παρατηρήθηκε ανάπτυξη: (●) 100% ανάπτυξη, (◆) 50% ανάπτυξη, (▲) 25% ανάπτυξη, (○) 0% ανάπτυξη. Με αστερίσκο συμβολίζονται οι συνδυασμοί pH και NaCl που επιλέχθηκαν στην παρούσα μελέτη.

2.5.2. Εκτίμηση οξεοαθεκτικότητας του *L. monocytogenes*

Για τον προσδιορισμό της απόκρισης του *L. monocytogenes* έναντι όξινης καταπόνησης μετά συντήρηση 24h σε υποθανάτιες συνθήκες pH και NaCl, 10mL καλλιέργειας συλλέγονταν με φυγοκέντρηση (10min στις 3600 στροφές ανά λεπτό, rpm στους 7°C) και το ίζημα που προέκυπτε επαναδιαλυόταν σε 10mL προθερμασμένου στους 37°C, TSBYE pH 2.0 (ρυθμισμένο μετά την αποστείρωση με HCl 6N). Η εκτίμηση των επιβιωσάντων

κυττάρων κατά τη διάρκεια της όξινης καταπόνησης πραγματοποιούνταν σε τακτά χρονικά διαστήματα για χρόνο 5min έως 40 min (ανάλογα με την ένταση των προηγούμενων συνθηκών επώασης) με επιφανειακή επίστρωση σε στερεό θρεπτικό υλικό TSAYE (30°C για 48h). Ο αρχικός πληθυσμός υπολογιζόταν πριν την έκθεση στο TSBYE pH 2.0.

Ως παράμετρος της οξεοανθεκτικότητας του μικροοργανισμού χρησιμοποιήθηκε ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού $D_{pH\ 2.0}$ values. Οι επιβιώσαντες πληθυσμοί του παθογόνου κατά τη διάρκεια της έκθεσής του σε pH 2.0 χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των καμπυλών απενεργοποίησης μέσω του λογισμικού GInaFiT (Geeraerd et al, 2005). Τα δεδομένα επιβίωσης του μικροοργανισμού προσαρμόστηκαν στο μοντέλο Biphasic (Cerf, 1977). Για κάθε μια επανάληψη των B και C δημιουργήθηκε μια καμπύλη απενεργοποίησης, δύο φάσεων, η κάθε μία από τις οποίες περιγράφεται από μία τιμή k_{max} . Κατά συνέπεια υπολογίστηκαν δύο παράμετροι $D_{pH\ 2.0}$ για κάθε μία καμπύλη απενεργοποίησης μέσω του μαθηματικού τύπου $D = \frac{ln_{10}}{k_{max}}$, οι οποίες αντιστοιχούν στις δύο επιμέρους φάσεις της καμπύλης

2.5.3. Εκτίμηση παραλλακτικότητας παραμέτρων θανάτωσης

Για την εκτίμηση της παραλλακτικότητας στην παράμετρο οξεοανθεκτικότητας $D_{pH:2.0}$ του μικροοργανισμού χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω δείκτες-συντελεστές:

α) ο συντελεστής μεταβλητότητας (Coefficient of Variation- %CV)

$$CV(\%) = \frac{\text{τυπική απόκλιση}}{\text{Μεση τιμή}} \cdot 100 = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

β) η Ρίζα του Μέσου Τετραγώνου του Σφάλματος (Root Mean Squared Error– RMSE), η οποία αποτελεί τον λόγο του αθροίσματος των τετραγώνων των καταλοίπων (RSS, Residual sum of Squares) προς τους βαθμούς ελευθερίας (DF, Degrees of freedom).

$$RMSE = \sqrt{\frac{RSS}{DF}}$$

Η Βιολογική, η πειραματική παραλλακτικότητα και πειραματική ανά επίπεδο εμβολίου παραλλακτικότητα εκτιμήθηκε με τις παρακάτω εξισώσεις σύμφωνα με τους Arvani et al. (2015).

Βιολογική παραλλακτικότητα

$$RMSE = \sqrt{\frac{RSS}{DF}} = \sqrt{\frac{\sum_{B=1}^3 (\overline{X_{BC}} - \overline{X_{Date}})^2}{n - p}}$$

Όπου

$\overline{X_{BC}}$: ο μέσος όρος του χρόνου υποδεκαπλασιασμού Dvalue όλων των πειραματικών επαναλήψεων εντός μίας βιολογικής επανάληψης

$\overline{X_{DATE}}$: ο μέσος όρος του χρόνου υποδεκαπλασιασμού Dvalue όλων των βιολογικών επαναλήψεων (δηλαδή των ανεξάρτητων επαναλήψεων του πειράματος σε διαφορετικές ημερομηνίες)

DF : Βαθμοί ελευθερίας όπου n αριθμός των παραμέτρων και p αριθμός των παραγόντων που επιδρούν στην παραλλακτικότητα πχ στην περίπτωση αυτή διεξάχθηκαν 3 βιολογικές επαναλήψεις, άρα n=3 και p=1

Πειραματική παραλλακτικότητα

$$RMSE = \sqrt{\frac{RSS}{DF}} = \sqrt{\frac{\sum_{B=1}^3 \sum_{E=1}^{30} (x - \overline{X_{BC}})^2}{n - p}}$$

Όπου

x: κάθε παρατήρηση του του χρόνου υποδεκαπλασιασμού Dvalue

$\overline{X_{BC}}$: ο μέσος όρος του χρόνου υποδεκαπλασιασμού Dvalue όλων των πειραματικών επαναλήψεων εντός μίας βιολογικής επανάληψης

DF: Βαθμοί ελευθερίας όπου n αριθμός των παραμέτρων και p αριθμός των παραγόντων που επιδρούν στην παραλλακτικότητα πχ στην περίπτωση της μελέτης οξεοανθεκτικότητας όπου B=5, C=5 και Dates=3, n=30 και p=3

Σ_B άθροισμα των βιολογικών επαναλήψεων

Σ_E άθροισμα πειραματικών επαναλήψεων

2.6. Εκτίμηση της παραλλακτικότητας των σχετικών επιπέδων γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε οριακές για την ανάπτυξη συνθήκες pH και NaCl

2.6.1. Σκοπός

Με σκοπό την μελέτη επίδρασης της παραμονής του *L. monocytogenes* σε υποθανάτιες συνθήκες στη γονιδιακή έκφραση του παθογόνου εκτιμήθηκε η παραλλακτικότητα της σχετικής μεταβολής των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης γονιδίων σχετιζόμενων α) με μηχανισμούς απόκρισης έναντι καταπονήσεων (*gad2*, *sigB*) και β) με τη λοιμοξιογόνο δράση του μικροοργανισμού (*prfA*).

2.6.2 Εμβολιασμός και συνθήκες συντήρησης

Η μελέτη επίδρασης των συνδυασμών pH-NaCl στα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων γινόταν μετα απο παραμονή σε TSBYE pH (5.0-7.2), NaCl (0-8% w/V) στους 7°C για 24h. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν οι παρακάτω συνθήκες:

- pH 5.2-2% NaCl
- pH 5.0-2% NaCl
- pH 5.5-2% NaCl
- pH 6.4-8% NaCl
- pH 7.2

Οι οποίες επιτρέπουν ανάπτυξη αλλά χαρακτηρίζονται από μεγάλη παραλλακτικότητα ικανότητα ανάπτυξης, συνθήκες που δεν επέτρεψαν ανάπτυξη (σύμφωνα με το όριο ανάπτυξης που τέθηκε, $O.D \geq 0.2$ που τέθηκε) αλλά χαρακτηρίζονται από μεγάλη

παραλλακτικότητα στην ικανότητα ανάπτυξης, και συνθήκες που παρουσιάζουν παραλλακτικότητα στην ικανότητα επιβίωσης σε μετέπειτα ισχυρή όξινη καταπόνηση.

Το εμβόλιο του μικροοργανισμού που χρησιμοποιήθηκε προήλθε μόνο από διαφορετικές αποικίες (C) (πειραματικές επαναλήψεις) (n=5), ενώ πραγματοποιήθηκαν τρεις (3) ανεξάρτητες επαναλήψεις, σε διαφορετικές ημέρες, ολόκληρου του πειραματικού σχεδιασμού (βιολογική επανάληψη) (Dates) n=3. Ο πειραματικός σχεδιασμός περιελάμβανε μόνο διαφορετικές αποικίες για τον ανεξάρτητο εμβολιασμό των πειραματικών επαναλήψεων την εκάστοτε βιολογική επανάληψη, με σκοπό την παραλαβή όλων των δυνατών αποκρίσεων του μικροοργανισμού (σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης) και συνεπώς καλύτερη περιγραφή της παραλλακτικότητας της γονιδιακής έκφρασης

2.6.3 Συλλογή βιομάζας

Δείγματα για RNA λαμβάνονταν μετά από 24h παραμονής σε TSBYE pH (5.0-7.2), NaCl (2-10% w/V) στους 7°C. Η σταθεροποίηση του RNA επιτυγχανόταν με την προσθήκη διαλύματος 95% ethanol-5% acid phenol και εν συνεχεία η βιομάζα (βακτηριακά κύτταρα) συλλεγόταν με φυγοκέντρηση για 10min στις 3600rpm στους 4°C. Ακολουθούσε απόρριψη υπερκείμενου και αποθήκευση των βακτηριακών κυττάρων στους -20°C.

2.6.4 Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο hot phenol/ SDS, όπως περιγράφεται από τους Jahn et al. (2008), με ορισμένες τροποποιήσεις. Αρχικά προηγείτο λύση των κυττάρων με προσθήκη 500μl διαλύματος λύσης (Tris 10mM, 1mM EDTA, pH 8,0 και 10mg/mL λυσοζύμη) και επώαση στους 37°C για 15min. Στη συνέχεια, προστίθετο 50μL SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, 10% w/V) και επώαση στο 65°C για 3min. Ακολούθως, προστίθετο 15μL CH₃COONa (3M, pH 5.2) και 600μL προθερμασμένη όξινη φαινόλη (65°C) και επωάζονταν στο 65°C για 6min. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνταν άμεσα στον πάγο, όπου και παρέμεναν για 2min. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 5min. Έπειτα το υπερκείμενο

μεταφερόταν σε νέο σωλήνα eppendorf και προστίθεντο 1V φαινόλης:χλωροφορμίου:ισοαμυλική αλκοόλης (24:24:1), αναδεύεται και φυγοκεντρούταν στις 13000rpm για 3min. Επαναλαμβάνεται το προηγούμενο βήμα και ακολούθως το υπερκείμενο μεταφερόταν σε 1V χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1 v/v) και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 3min. Η κατακρήμνιση του RNA πραγματοποιούταν με την προσθήκη 2.5V αιθανόλης (95-100%) και 1/10V CH₃COONa (3M, pH 4,8) και ακόλουθη επώαση στους -80°C O/N. Η παραλαβή των νουκλεϊνικών γινόταν με φυγοκέντρηση στους 4°C, στις 13000rpm για 30min, καθαρισμό με αιθανόλη 70% v/v και φυγοκέντρηση στους 4°C, στις 13000rpm για 30min. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απομακρυνόταν και τα ιζήματα αφήνονταν να στεγνώσουν για περίπου 30min. Το RNA επαναδιαλύεται σε 25μl ddH₂O και φυλασσόταν στους -80°C. Η συγκέντρωση του RNA προσδιοριζόταν φωτομετρικά (Implen, NanoPhotometer) με μέτρηση της απορρόφησης στα 260nm. Η καθαρότητα των νουκλεϊνικών οξέων προσδιοριζόταν από το λόγο A_{260nm}/A_{280nm}.

2.6.5 Χειρισμός με DNAση

Με σκοπό τον καθαρισμό του RNA, που προορίζεται για ανάστροφη μεταγραφή, από εναπομείναν DNA χρησιμοποιήθηκε η δεοξυριβονουκλεάση (deoxyribonuclease, DNase) που καταλύει την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών στην αλυσίδα του DNA. Επιλέχθηκε η RQ1 (RNA Qualified) DNAση (Promega) που ανήκει στον τύπο 1 και υδρολύει μονόκλωνο ή δίκλωνο DNA παράγοντας 3'-OH ολιγονουκλεοτίδια. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας και περιλαμβάνει τα εξής (**Πίνακας 2.1**):

Πίνακας 2.1 Αρχική συγκέντρωση συστατικών αντίδρασης DNάσης

Συστατικά αντίδρασης	Αρχική ποσότητα
Ολικό RNA	≈4000ng
Ρυθμιστικό διάλυμα DNάσης 1	10X
DNάση 1	1 unit/μL
ddH ₂ O	-

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 37 °C για 1 ώρα. Ακολούθησε προσθήκη 1/10 V διαλύματος απενεργοποίησης της DNάσης (DNase stop solution) και επώαση στους 65 °C για 10 min.

Ακολούθησε καθαρισμός των νουκλεϊνικών οξέων με φαινόλη-χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση των νουκλεϊνικών με χρήση παγωμένης αιθανόλης. Πιο συγκεκριμένα προστέθηκε αρχικά ddH₂O έως ο όγκος να είναι 300μL. Έπειτα προστέθηκε ίσος όγκος φαινόλης και ακολουθεί καλή ανάδευση. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 13000 rpm για 5 min. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό σωλήνα Eppendorf και προστέθηκε ίσος όγκος sevag. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και vortex και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 5 min. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό σωλήνα Eppendorf και προστέθηκε 1/10 V CH₃COONa (3M, pH 4.8) και 2.5 V αιθανόλη 100%. Το δείγμα αναδεύτηκε ελαφρώς αναποδογυρίζοντας το σωλήνα Eppendorf περίπου 30 φορές και τοποθετήθηκε στους -80 °C O/N. Έπειτα ακολουθήσε φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 30 min στους 4°C. Προστέθηκε αιθανόλη 70%, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 13000 rpm για 30 min, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και αφού οι σωλήνες στεγνώσουν γίνεται επαναδιάλυση σε 15 μL ddH₂O. Στην συνέχεια έγινε ποσοτικός προσδιορισμός του RNA μέσω φωτομέτρησης (Implen, NanoPhotometer). Ακολούθως, τα δείγματα RNA ελέγχονταν για την παρουσία υπολειμμάτων DNA πραγματοποιώντας Real time PCR και εξειδικευμένους εκκινητές (*16S rRNA*), όπως περιγράφεται σε ακόλουθη παράγραφο.

2.6.6 Δημιουργία cDNA

Η ανάστροφη μεταγραφή είναι μια διαδικασία κατά την οποία χρησιμοποιώντας ως μήτρα RNA στην αντίδραση της PCR κατασκευάζονται αλυσίδες cDNA, συμπληρωματικές ως προς το mRNA που απομονώθηκε, με την δράση του ενζύμου ανάστροφη μεταγραφάση. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το σύστημα SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η αντίδραση περιελάμβανε τα εξής (Πίνακας 2.2)

Πίνακας 2.2 Αρχική συγκέντρωση συστατικών αντίδρασης (1) για την δημιουργία cDNA

Συστατικά αντίδρασης		Αρχική συγκέντρωση
Μήτρα RNA	RNA	≈300ng
	H ₂ O	-
dNTPs		10mM
Τυχαία εξαμερή		50ng

Ακολουθούσε η αποδιάταξη του RNA στους 65°C για 5min και έπειτα η άμεση μεταφορά σε πάγο για 2min. Στην συνέχεια προστίθεντο τα υπόλοιπα αντιδραστήρια, όπως αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.(Πίνακας 2.3)

Πίνακας 2.3 Αρχική συγκέντρωση συστατικών αντίδρασης (2) για την δημιουργία cDNA

Συστατικά αντίδρασης	Αρχική συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα	5X
DTT	0.1
Αναστολέας RNάσης	50ng
ddH ₂ O	-

Ακολούθως η αντίδραση παρέμενε στους 25 °C για 2min. Τέλος, προστίθετο η ανάστροφη μεταγραφάση Superscript II (50units/μL) σε τελικό όγκο αντίδρασης 20μL και στη συνέχεια ακολουθούσε το παρακάτω θερμοκρασιακό πρόγραμμα: 25 °C για 10min, 42 °C για 1h, 70 °C για 15min. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας τα δείγματα φυλλάσσονταν στους -20 °C.

2.6.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time PCR)

Η Real time PCR πραγματοποιήθηκε στη συσκευή StepOne Plus (Applied Biosystems). Οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν για τα υπό μελέτη γονίδια, προέκυψαν μετά από βιβλιογραφική αναζήτηση και φαίνονται στον **Πίνακα 2.4**. Η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης PCR (PCR efficiency, E) για κάθε ζεύγος εκκινήτων προσδιορίστηκε βάσει της εξίσωσης $E=10^{-1/\text{slope}}$ (Pfaffl, 2004), χρησιμοποιώντας διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις cDNA και ήταν 1.94-1.97

Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνταν σε όγκο 10μl, χρησιμοποιώντας 1μl cDNA ως μήτρα, το έτοιμο συμπυκνωμένο μείγμα 2X KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X)ABI Prism™ (Kapa Biosystems) σε τελική συγκέντρωση 1X και τους εξειδικευμένους πρόσθιους και ανάστροφους για κάθε γονίδιο εκκινήτες (**Πίνακας 2.4**) σε τελική ποσότητα 0.2μ mol. Για όλα τα γονίδια ακολουθήθηκε τα παρακάτω θερμοκρασιακό πρόγραμμα: 95°C για 1min, 40 κύκλοι των 95°C για 3sec, 59°C για 30sec, 72°C για 30sec, ενώ ακολουθούσε ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης (Melting Curve Analysis) ως εξής: 95°C για 15sec, 50°C για 1min και σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 0.3°C/ sec έως τους 95°C, όπου παρέμενε για 15sec. Για κάθε γονίδιο, περιλαμβανόταν θετικός μαρτυράς με DNA του *L. monocytogenes* και αρνητικός μάρτυρας με νερό.

Πίνακας.2.4 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη Real Time PCR

Γονίδιο Στόχος	Ορθός εκκινητής 5'→3'	Ανάστροφος εκκινητής 5'→3'	Προϊόν (bp)	Πηγή
<i>gad2</i>	AATACCTTGCCCATGCAGTC	GGCTTGGAAATCTTGGATGA	268	Karatzas et al., 2010
<i>sigB</i>	TCATCGGTGTACGGAAGAA	TGACGTTGGATTCTAGACAC	310	Bae et al., 2011
<i>prfA</i>	GATACAGAAACATCGGTTGGC	GTGTAATCTTGATGCCATCAGG	340	Chatterjee et al., 2006
<i>16SrRNA</i>	TGGGGAGCAAACAGGATTAG	TAAGGTTCTTCGCGTTGCTT	213	Karatzas et al., 2010
<i>rpoB</i>	TCGCAGTTATCTCAGTTCATGG	TAGCGCACGGTTACTATCATCG	520	Makariti et al., 2015

Τα επίπεδα έκφρασης των διαφορετικών γονιδίων κανονικοποιήθηκαν με τη βοήθεια των γονιδίων αναφοράς *16SrRNA* και *rpoB*, ως καθολικά εκφραζόμενα γονίδια σε συνθήκες όξινης και ωσμωτικής καταπόνησης (reference gene). Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η σχετική μεταβολή των επιπέδων μεταγραφής ως προς το μάρτυρα (δηλαδή pH 7.2, μηδενική ημέρα), σύμφωνα με τη μέθοδο του Pfaffl 2001, η οποία λαμβάνει υπ' όψη τους πιθανόν διαφορετικούς συνετελεστές αποτελεσματικότητας (E) των υπό μελέτη γονιδίων.

2.6.8 Εκτίμηση επιπέδων παραλλακτικότητας στην σχετική έκφραση των γονιδίων

Ο προσδιορισμός της παραλλακτικότητας στη μεταβολή των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης έγινε με τον υπολογισμό του RMSE. Η βιολογική, και η συνολική πειραματική παραλλακτικότητα των σχετικών επιπέδων έκφρασης εκτιμήθηκε με τις παρακάτω εξισώσεις σύμφωνα με τους Aryani et al. (2015).

Βιολογική παραλλακτικότητα

$$RMSE = \sqrt{\frac{RSS}{DF}} = \sqrt{\frac{\sum_{B=1}^3 (\bar{X}_C - \bar{X}_{Date})^2}{n - p}}$$

Όπου

\bar{X}_C : ο μέσος όρος των σχετικών επιπέδων έκφρασης όλων των πειραματικών επαναλήψεων εντός μίας βιολογικής επανάληψης

\bar{X}_{DATE} : ο μέσος όρος των σχετικών επιπέδων έκφρασης όλων των βιολογικών επαναλήψεων (δηλαδή των ανεξάρτητων επαναλήψεων του πειράματος σε διαφορετικές ημερομηνίες)

DF : Βαθμοί ελευθερίας όπου n αριθμός των παραμέτρων και p αριθμός των παραγόντων που επιδρούν στην παραλλακτικότητα πχ στην περίπτωση αυτή διεξάχθηκαν 3 βιολογικές επαναλήψεις , άρα n=3 και p=1

Πειραματική παραλλακτικότητα

$$RMSE = \sqrt{\frac{RSS}{DF}} = \sqrt{\frac{\sum_{B=1}^3 \sum_{E=1}^{15} (x - \bar{X}_C)^2}{n - p}}$$

Όπου

x: τιμή κάθε παρατήρησης σχετικών επιπέδων έκφρασης

\bar{X}_C : ο μέσος όρος των σχετικών επιπέδων έκφρασης όλων των πειραματικών επαναλήψεων εντός μίας βιολογικής επανάληψης

DF: Βαθμοί ελευθερίας όπου n αριθμός των παραμέτρων και p αριθμός των παραγόντων που επιδρούν στην παραλλακτικότητα πχ στην περίπτωση της μελέτης οξεοανθεκτικότητας όπου C=5 και Dates=3, n=15 και p=3

\sum_B άθροισμα των βιολογικών επαναλήψεων

\sum_E άθροισμα πειραματικών επαναλήψεων

2.7. Στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση διακύμανσης των μέσων όρων για την εκάστοτε υπό μελέτη εξαρτημένη μεταβλητή μεταξύ περισσότερων των δύο (2) ομάδων, πραγματοποιήθηκε με Post Hoc ανάλυση και κριτήριο Tukey-HSD. Στην περίπτωση της σύγκρισης μέσων όρων της εκάστοτε εξαρτημένης μεταβλητής ανάμεσα σε δύο (2) ομάδες χρησιμοποιήθηκε το Students t test.

3.Αποτελέσματα

3.1 Εκτίμηση της παραλλακτικότητας στην ικανότητα ανάπτυξης του *Listeria monocytogenes* υπό την επίδραση υποθανάτιων συνδυασμών pH και NaCl.

Με σκοπό τη μελέτη της παραλλακτικότητας στην απόκριση του *L. monocytogenes* υπο την επίδραση υποθανάτιων συνθηκών pH και NaCl, χρησιμοποιήθηκε TSBYE με ποικίλους συνδυασμούς pH (5.0-7.2) και NaCl (0-10% w/v), το οποίο τοποθετήθηκε σε τριβλία μικροτιλοδότησης και εμβολιάστηκε με $7 \log$ CFU/mL του παθογόνου μικροοργανισμού, ενώ ακολούθησε συντήρηση στους 7°C για 20 ημέρες. Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού καταγραφόταν κατά τη διάρκεια της συντήρησης με μέτρηση της οπτικής τους πυκνότητας (680nm) δύο (2) φορές ανά ημέρα. Με σκοπό την εκτίμηση της πειραματικής παραλλακτικότητας χρησιμοποιήθηκε εμβόλιο που προετοιμάστηκε από διαφορετικές αποικίες (n=15) (C), από ίδια αποικία και διαφορετικές Β' ανανεώσεις (n≤15) (B), από ίδια αποικία, ίδια Β' ανανέωση (n≤15) (T), ενώ διενεργήθηκαν τρεις (n=3) ανεξάρτητες επαναλήψεις ολόκληρου του πειραματικού σχεδιασμού, σε διαφορετικές ημέρες (dates) για τον προσδιορισμό της βιολογικής παραλλακτικότητας.

Για τη δημιουργία των καμπυλών ανάπτυξης, οι ληφθέντες τιμές της οπτικής απορρόφησης διορθώθηκαν με αφαίρεση του μάρτυρα (δηλαδή της οπτικής απορρόφησης του ανεμβολίαστου θρεπτικού μέσου). Κάθε καμπύλη ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό α) του ρυθμού ανάπτυξης (growth rate, gr) και β) του χρόνου προσαρμογής (lag time) μέσω του λογισμικού DMFit (Baranyi & Roberts 1994) και γ) το εμβαδού υπό της καμπύλης ανάπτυξης. Ως όριο ανάπτυξης βάσει OD θεωρήθηκε το 0.2, ενώ βάσει του εμβαδού το όριο ανάπτυξης διαμορφώθηκε σε τιμή 60.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ανάπτυξη (O.D.≥0.2) παρατηρήθηκε μόνο στις συνθήκες όπου pH >5.2 και 2-4 % w/v NaCl (**Σχήμα 3.1**), ενώ σε συγκεντρώσεις άλατος 8-10 % w/v αναστέλλεται πλήρως η ανάπτυξη του παθογόνου. Εξαιρέση αποτελεί το pH 6.4, όπου επιτρέπει την ανάπτυξη του παθογόνου σε NaCl 8 % w/v στο 60% των επαναλήψεων (n=135). Αντίστοιχα, οι συνδυασμοί pH-NaCl 5.5 2%, 5.5 4% και 6.0 6%

επέτρεψαν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού στο 75%, 45% και 98% των επαναλήψεων (n=135) αντίστοιχα. Κατά συνέπεια, διαμορφώνεται μία περιοχή συνδυασμών pH-NaCl στην οποία παρατηρείται ανάπτυξη του *L.monocytogenes* σε λιγότερο από το 100% των επαναλήψεων. Η περιοχή αυτή θα αναφέρεται ως περιοχή ανάπτυξης-μη ανάπτυξης. Στην περιοχή αυτή συμπεριλαμβάνεται και το pH 5.2 2% w/v NaCl, συνθήκη η οποία δεν ικανοποίησε το κριτήριο $O.D.\geq 0.2$, αλλά το προσέγγισε επιτυγχάνοντας μέγιστο $O.D.\leq 0.19$ το οποίο αντιστοιχεί σε τελικό βακτηριακό πληθυσμό (μετά από 20 ημέρες συντήρησης στους 7°C) περίπου 8 log CFU/ mL (**Σχήμα 3.16**).

Όσον αφορά στην παραλλακτικότητα σε επίπεδο ανάπτυξης, παραλλακτικότητα εμφανίζεται και στις τρεις παραμέτρους ανάπτυξης που μελετήθηκαν, δηλαδή στο εμβαδόν υπο της καμπύλης ανάπτυξης (**Σχήμα 3.2**), στο ρυθμό αύξησης (g.t) (**Σχήμα 3.3**) και στο χρόνο προσαρμογής (**Σχήμα 3.4**). Συγκεκριμένα την μεγαλύτερη παραλλακτικότητα εμφάνισαν οι περιπτώσεις στην περιοχή (pH-NaCl) ανάπτυξης-μη ανάπτυξης, όπως αποδεικνύεται από τις τιμές CV_E έως 49% (**Σχήμα 3.13-15**) και $RMSE_E$ πειραματικής παραλλακτικότητας 9.81-13.91 (**Σχήμα 3.7-12**) έναντι της συνθήκης pH 7.2 (CV_E 14%, $RMSE_E$ 5.9). Οι τιμές $RMSE$ και CV των παραμέτρων ανάπτυξης για τις προαναφερθείσες συνθήκες παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον **Πίνακα 3.1**.

Στους ακραίους συνδυασμούς pH, NaCl που δεν επιτρέπουν ανάπτυξη, (όπως pH<5.2-και 2-4% w/v NaCl ή pH \geq 5.5 και NaCl> 6% w/v) η παραλλακτικότητα παραμένει χαμηλή με εύρος E 10-30 (ο ρυθμός ανάπτυξης και ο χρόνος προσαρμογής δεν υπολογίστηκαν για αυτές τις συνθήκες δεδομένου ότι δε παρατηρήθηκε αύξηση του μικροοργανισμού). Ωστόσο ο Συντελεστής Μεταβλητότητας CV_E (%) που προκύπτει κυμαίνεται από 20-70%. Οι υψηλές αυτές τιμές του CV όμως είναι πλασματικές δεδομένου ότι ο CV για περιπτώσεις όπου η τυπική απόκλιση στα μέτρα ανάπτυξης είναι παρόμοια, ο CV θα αυξηθεί όσο οι συνθήκες γίνονται πιο περιοριστικές για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού (Aryani et al., 2015, Lianou & Koutsoumanis, 2011). Αντιθέτως, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 3.7**, όπου απεικονίζεται η πειραματική παραλλακτικότητα βάσει του εμβαδού υπό κ.α ($RMSE_E$) οι ακραίοι συνδυασμοί pH-NaCl καθώς και η βέλτιστη συνθήκη ανάπτυξης pH 7.2 παρουσιάζουν χαμηλή παραλλακτικότητα $RMSE_E\leq 7$. Από

την άλλη μεριά, συνθήκες pH NaCl παρουσίασαν την μεγαλύτερη πειραματική παραλλακτικότητα στην ανάπτυξη με τον συντελεστή $RMSE_E$ να κυμαίνεται από 9 έως 13. **Πίνακας 3.1**

Πίνακας 3.1 Συγκεντρωτικός πίνακας μέτρων παραλλακτικότητας κατά την ανάπτυξη για συνθήκες pH και NaCl στην περιοχή ανάπτυξης μη ανάπτυξης

<i>pH & NaCl</i>	% δειγμάτων (<i>O.D.</i> ≥0.2) (<i>n</i> =135)	<i>Εμβαδό υπό της καμπύλης ανάπτυξης (E)</i>				<i>Ρυθμός αύξησης</i>	<i>Χρόνος προσαρμογής</i>
		<i>E</i>	<i>Μέση τιμή E</i>	<i>CV_E (%)</i>	<i>RMSE_E</i>	<i>RMSE</i> <i>log (g.r.)</i>	<i>RMSE_{χρόνου}</i> <i>προσαρμογής</i>
5.5 2%	75%	42-105	14.73	18.35	9.81	0.11	9.35
5.5 4%	45%	13-100	20.25	35.85	8.71	0.16	36.40
6.0 6%	98%	57-185	26.09	23.66	14.44	0.06	10.17
6.4 6%	100%	46-160	31.80	31.19	11.88	0.04	19.94
6.4 8%	60%	11-143	34.88	49.87	13.91	0.19	31.20

Όσον αφορά στους συνδυασμούς pH-NaCl που επέτρεψαν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού (7°C) η συγκέντρωση του άλατος φαίνεται να επιδρά τόσο στο χρόνο προσαρμογής, όσο και στη παραλλακτικότητά του, κάτι που συμφωνεί και με τους Mellefont et al., 2004 a,b. Πιο συγκεκριμένα η παραμονή σε συνθήκες με ίδιες συγκέντρωσεις άλατος, ανεξαρτήτως pH, δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P>0.05$) στο χρόνο προσαρμογής. Αντίθετα η παραμονή του παθογόνου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος έχει ως αποτέλεσμα την διαμόρφωση χρόνων προσαρμογής οι οποίοι διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ($P<0.05$) (**Σχήμα 3.4**).

Η επίδραση παραγόντων καταπόνησης όπως pH, θερμοκρασία, αλατότητα κτλ στην κατανομή των χρόνων φάσης προσαρμογής και του ρυθμού ανάπτυξης έχουν μελετηθεί και από άλλους ερευνητές και παρατηρήθηκε ότι όσο οι παράγοντες καταπόνησης αυξάνονται η κατανομή των τιμών για τις παραμέτρους ανάπτυξης αυξάνεται

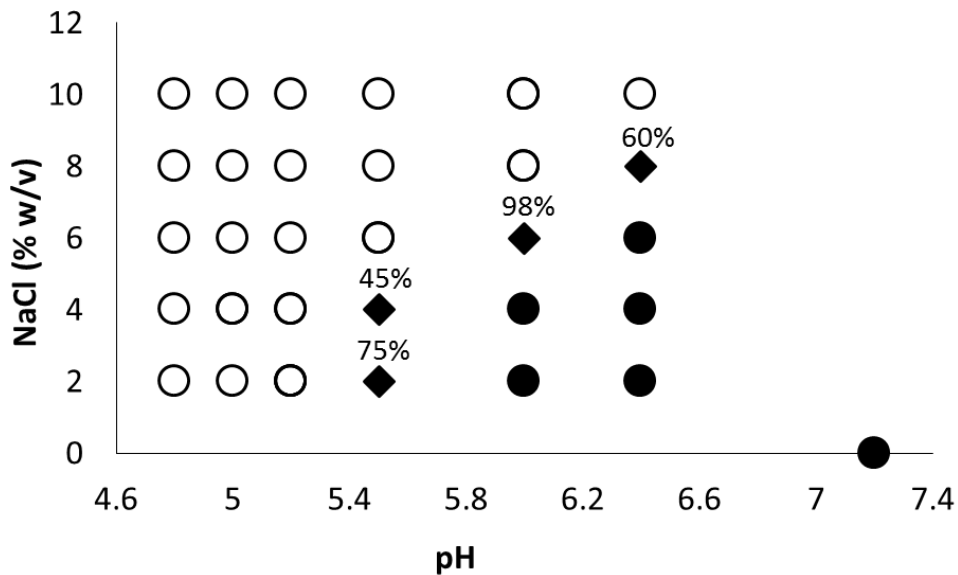
εμφανίζοντας μεγάλη παραλλακτικότητα στον τρόπο απόκρισης. (Smelt et al., 2002, McKellar et al., 2002, Robinson et al., 2001, Francois et al., 2006) ιδιαίτερα σε συνθήκες κοντά στα όρια ανάπτυξης -μη ανάπτυξης (Koutsoumanis, 2008).

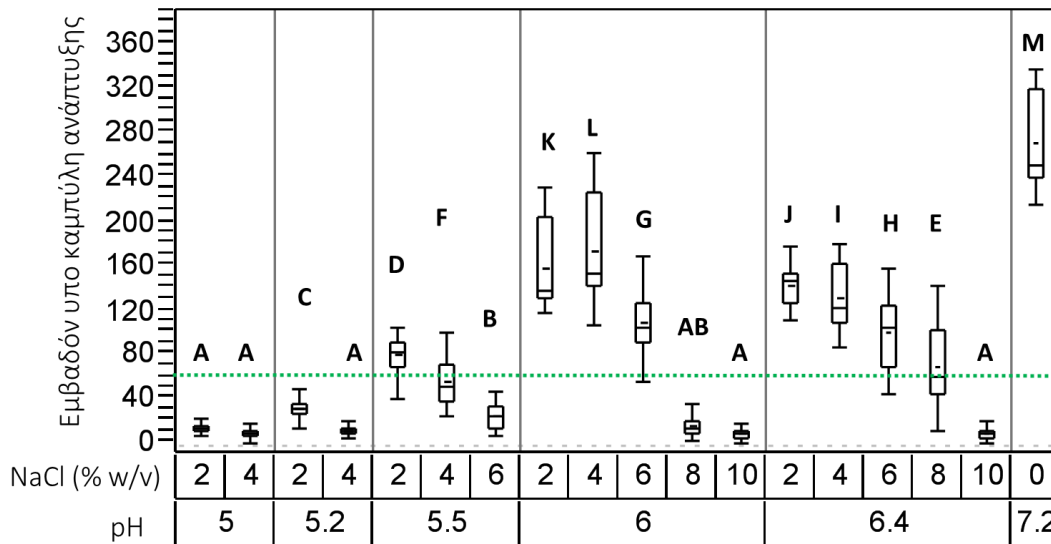
Τα παραπάνω συμπεράσματα συνάδουν με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών, (Makariti et al., 2015), όπου σε συνδυασμούς pH και NaCl που αντιστοιχούν κοντά στα όρια ανάπτυξης μη ανάπτυξης και συντήρηση στους 7°C σημειώθηκε ανάπτυξη από μόνο από ένα ποσοστό των εξετασθέντων δειγμάτων (n=4).

Η ικανότητα της ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε επίπεδο διαφορετικής προέλευσης εμβολίου είχε ως αποτέλεσμα παρόμοια πειραματική παραλλακτικότητα όπως καταδεικνύεται από τον υπολογισμό του συντελεστή RMSE για εμβαδό, ρυθμό αύξησης και χρόνο προσαρμογής (**Σχήμα 3.7-12**). Σε επίπεδο παραλλακτικότητας μεταξύ βιολογικών και πειραματικών επαναλήψεων, η τάση μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών συντήρησης (pH-NaCl) ήταν παρόμοια, με την παραλλακτικότητα να είναι μεγαλύτερη στις συνθήκες pH 5.5 2-4% w/v NaCl, pH 6.0 6% w/v NaCl, pH 6.4 6-8% w/v NaCl. Όμως, για κάθε συνδυασμό pH-NaCl, η βιολογική και πειραματική παραλλακτικότητα μεταξύ τους διαφέρουν, με την πειραματική παραλλακτικότητα να είναι υψηλότερη από τη βιολογική παραλλακτικότητα, όπως αποδεικνύεται και από τις αντίστοιχες τιμές του συντελεστή RMSE για χρόνο προσαρμογής και ρυθμό αύξησης, ενώ βάσεις του συντελεστή RMSE για το εμβαδόν η εικόνα αντιστρέφεται (βιολογική παραλλακτικότητα > πειραματική παραλλακτικότητα). (**Σχήμα 3.9, 3.11**). Το γεγονός ότι η πειραματική παραλλακτικότητα του χρόνου προσαρμογής και του ρυθμού ανάπτυξης είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη βιολογική παραλλακτικότητα, δύναται να οφείλεται στο μεγάλο αριθμό των πειραματικών επαναλήψεων (n=135), οι οποίες περιελάμβαναν και ως έναν επιπλέον παράγοντα παραλλακτικότητας τη διαφορετική προέλευση του εμβολίου. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη βέλτιστη περιγραφή της απόκρισης του παθογόνου εντός της κάθε βιολογικής επανάληψης με αποτέλεσμα να υπερκαλύπτεται η παραλλακτικότητα μεταξύ των ανεξάρτητων επαναλήψεων του πειραματικού σχεδιασμού (βιολογική παραλλακτικότητα). Το γεγονός δε, ότι η προέλευση του εμβολίου φαίνεται να μην επηρεάζει την παραλλακτικότητα στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού, υποδεικνύει ότι οι συνθήκες ανάπτυξης (συνδυασμοί

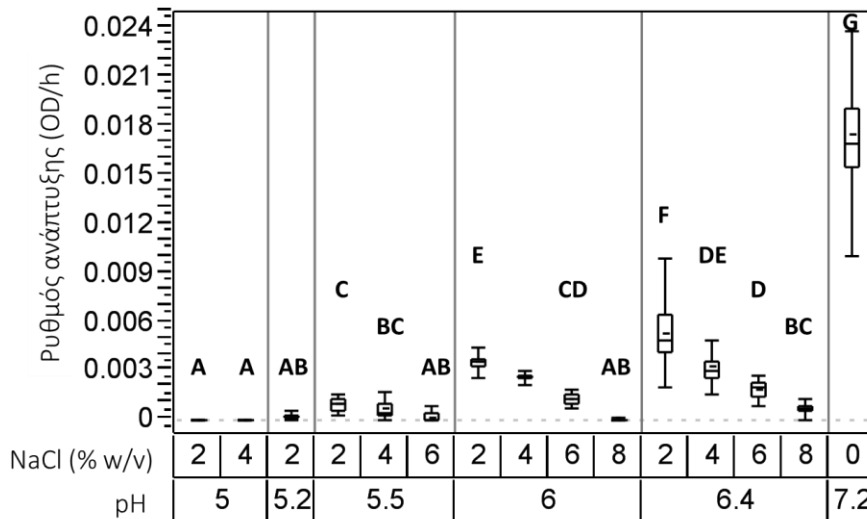
pH-NaCl) δηλαδή η ήπια ωσμωτική και όξινη καταπόνηση στην οποία εκτίθεται ο μικροοργανισμός επηρεάζουν την παραλλακτικότητα στην ανάπτυξη αυτού.

Σχήμα 3.1 Διάγραμμα ανάπτυξης-μη ανάπτυξης για την παραμονή του *L. monocytogenes* σε pH (5.0-7.2) NaCl (2-10% w/v). Τα ανοιχτά σχήματα συμβολίζουν τις συνθήκες που δεν επιτρέπουν ανάπτυξη και τα κλειστά σχήματα τις συνθήκες που επιτρέπουν ανάπτυξη με κριτήριο το όριο ανάπτυξης (O.D. \geq 0.2). Με ρόμβο συμβολίζονται οι περιπτώσεις που ορισμένο ποσοστό του πληθυσμού ξεπέρασε το όριο ανάπτυξης με τις αντίστοιχες τιμές.

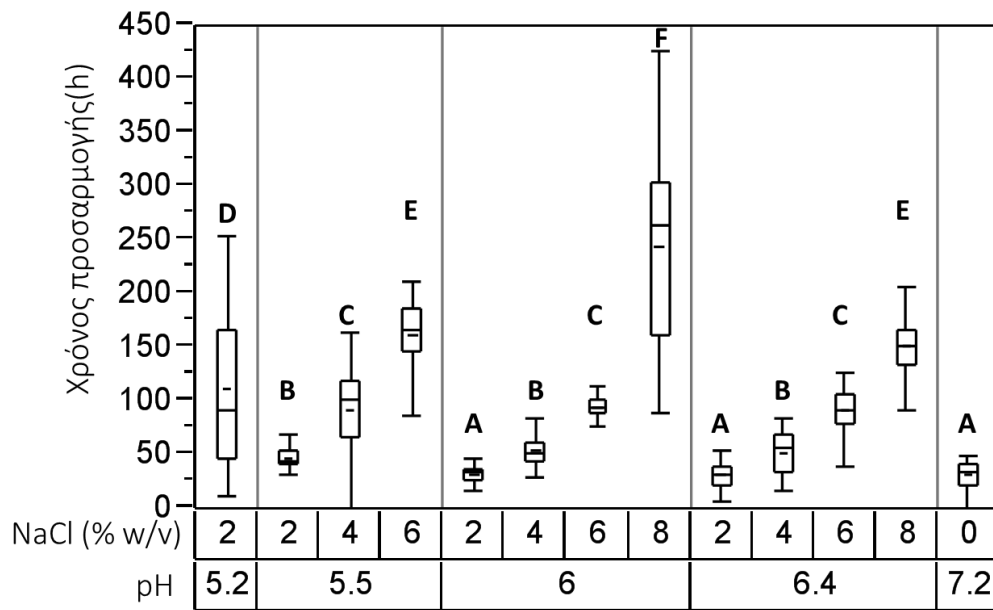




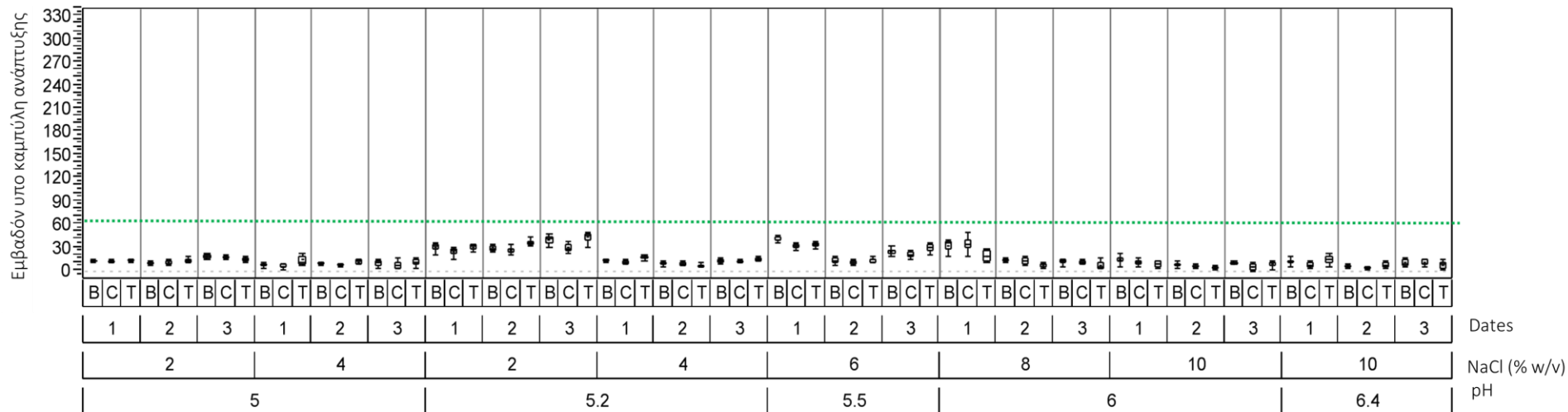
Σχήμα 3.2 Διαγραμματική απεικόνιση του εμβαδού υπό της καμπύλης ανάπτυξης κατά τη συντήρηση σε pH (5-7.2) και NaCl (0-10% w/v) στους 7°C. Με διακεκομμένη πράσινη γραμμή συμβολίζεται το κριτήριο ανάπτυξης Area \geq 60. Σημαντικές διαφορές ($P < 0.05$) σημειώνονται στις περιπτώσεις που δεν μοιράζονται ίδιο γράμμα.



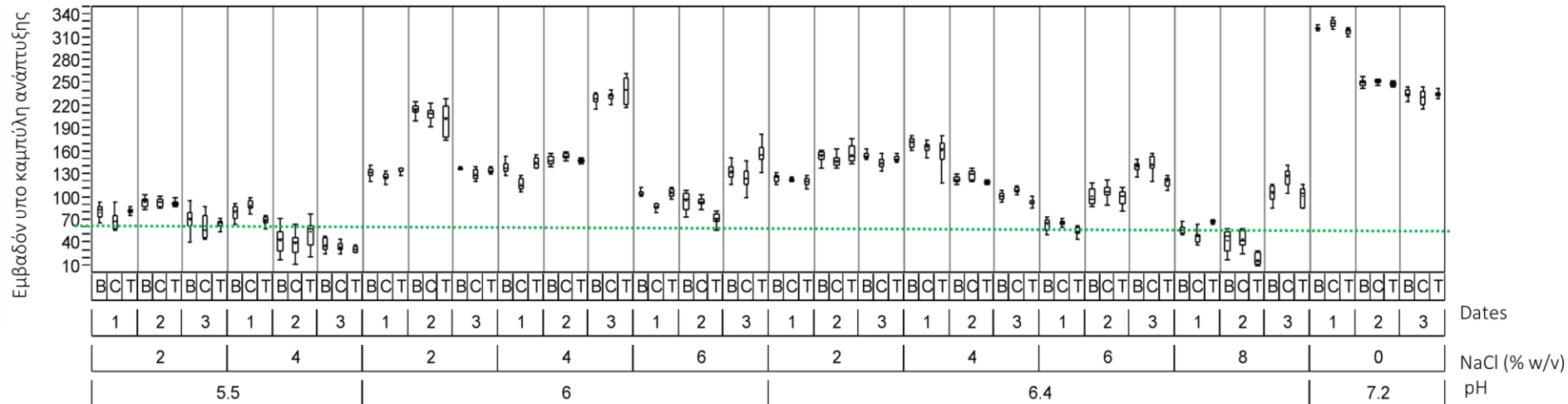
Σχήμα 3.3 Διαγραμματική απεικόνιση του ρυθμού ανάπτυξης (O.D./h) του *L. monocytogenes* κατά τη συντήρηση σε pH (5.0-7.2) και NaCl (0-10% w/v) στους 7°C, όπως υπολογίστηκε από τις καμπύλες ανάπτυξης μέσω του λογισμικού DMFit (Baranyi & Roberts, 1994). Σημαντικές διαφορές ($P < 0.05$) σημειώνονται στις περιπτώσεις που δεν μοιράζονται ίδιο γράμμα.



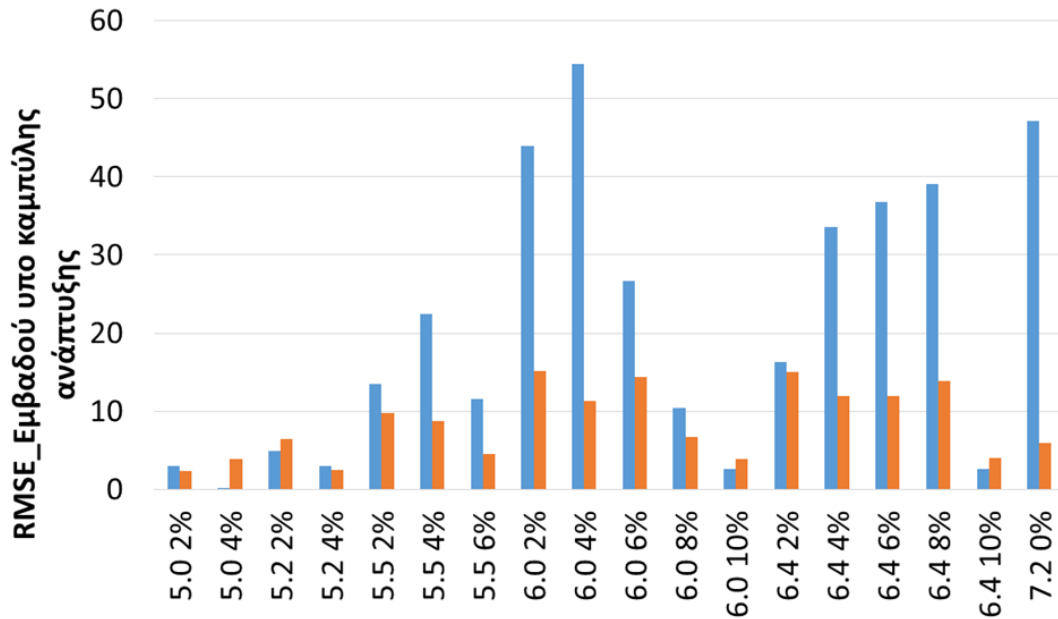
Σχήμα 3.4 Διαγραμματική απεικόνιση του χρόνου προσαρμογής (lag time, h) του *L. monocytogenes* κατά τη συντήρηση σε pH (5.0-7.2) και NaCl (0-10% w/v) στους 7°C, όπως υπολογίστηκε από τις καμπύλες ανάπτυξης μέσω του λογισμικού DMFit (Baranyi & Roberts, 1994). Σημαντικές διαφορές ($P < 0.05$) σημειώνονται στις περιπτώσεις που δεν μοιράζονται ίδιο γράμμα.



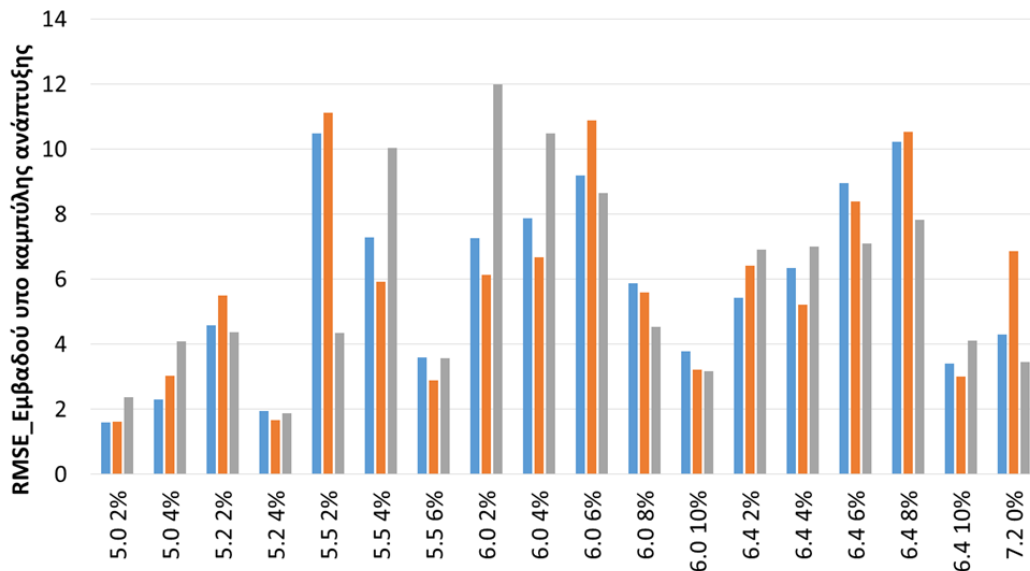
Σχήμα 3.5 Διαγραμματική απεικόνιση της επίδρασης της προέλευσης του εμβολίου στο εμβασδόν υπό της καμτύλης ανάπτυξης κατά τη συντήρηση του *L. monocytogenes* σε συνδυασμούς pH και NaCl που ανέστειλαν την ανάπτυξη του παθογόνου στους 7°C. Τα διαφορετικά εμβόλια προέκυψαν από (C): διαφορετικές αποκίες (n=15), (B): ίδια αποικία και διαφορετικές B' ανανεώσεις (n=15), (T): από ίδια αποικία και ίδια B' ανανέωση (τεχνική επανάληψη) (n=15), ενώ με τον όρο Dates περιγράφονται οι ανεξάρτητες επαναλήψεις, σε διαφορετικές ημέρες, ολόκληρου του πειραματικού σχεδιασμού (n=3). Με διακεκομμένη πράσινη γραμμή συμβολίζεται το κριτήριο ανάπτυξης Agea \geq 60.



Σχήμα 3.6 Διαγραμματική απεικόνιση της επίδρασης της προέλευσης του εμβολίου στο εμβασό υπό της καμπύλης ανάπτυξης κατά τη συντήρηση του *L. monocytogenes* σε συνδυασμούς pH και NaCl που επέτρεψαν την ανάπτυξη του παθογόνου στους 7°C. Τα διαφορετικά εμβόλια προέκυψαν από (C): διαφορετικές αποικίες (n=15), (B): ίδια αποικία και διαφορετικές B' ανανεώσεις (n=15), (T): από ίδια αποικία και ίδια B' ανανέωση (τεχνική επανάληψη) (n=15), ενώ με τον όρο Dates περιγράφονται οι ανεξάρτητες επαναλήψεις, σε διαφορετικές ημέρες, ολόκληρου του πειραματικού σχεδιασμού (n=3). Με διακεκομμένη πράσινη γραμμή συμβολίζεται το κριτήριο ανάπτυξης Area₆₀≥60.

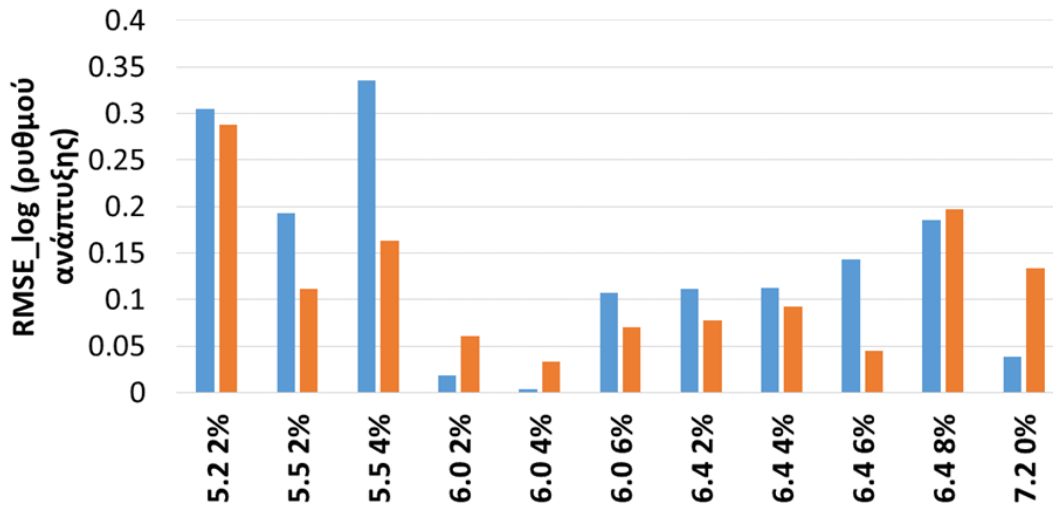


Σχήμα 3.7 Διαγραμματική απεικόνιση της βιολογικής (μπλε) και πειραματικής (πορτοκαλί) παραλλακτικότητας του εμβαδού υπο της καμπύλης ανάπτυξης για τις υποθανάτιες συνθήκες συντήρησης, (pH 5.0-7.2 & NaCl 0-10%, 7°C). Ως μέτρο παραλλακτικότητας χρησιμοποιήθηκε η Ρίζα του Μέσου Τετραγώνου του Σφάλματος (Root Mean Squared Error–RMSE), ο υπολογισμός του οποίου έγινε σύμφωνα με τους Ariany et al (2015).

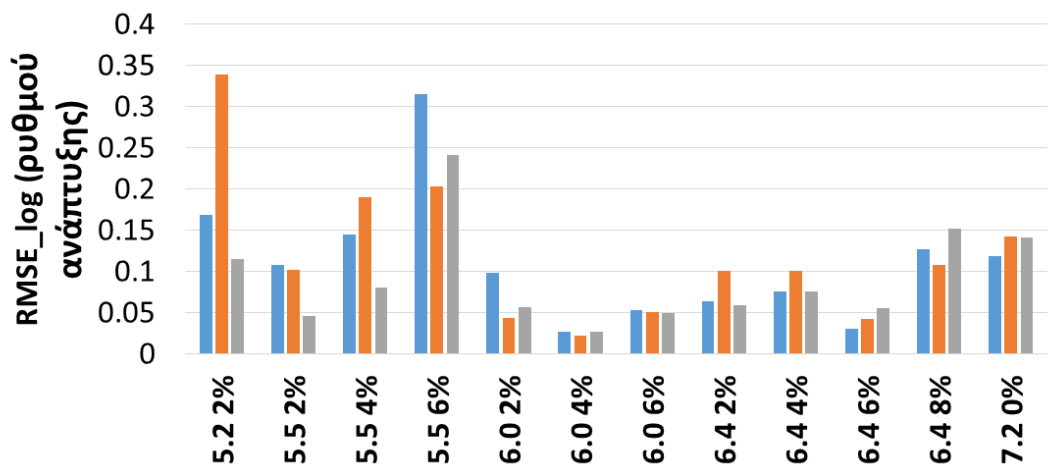


Σχήμα 3.8 Διαγραμματική απεικόνιση της παραλλακτικότητας ανάπτυξης (εμβαδόν υπό της καμπύλης ανάπτυξης) του *L. monocytogenes* σε επίπεδο διαφορετικής προέλευσης του εμβολίου, κατά τη συντήρησή του σε υποθανάτιες συνθήκες pH (5.0-7.2) και NaCl (0-10% w/v) και θερμοκρασία 7°C). Η Ρίζα του Μέσου Τετραγώνου του Σφάλματος (Root Mean Squared Error–RMSE) πειραματικής

παραλλακτικότητας του εμβαδού υπο της καμπύλης ανάπτυξης για τις υποθανάτιες συνθήκες συντήρησης, (pH 5.0-7.2 & NaCl 0-10%, 7°C) που μελετήθηκαν. Τα διαφορετικά εμβόλια προέκυψαν από (C): διαφορετικές αποικίες (n=15x3) (πορτοκαλί), (B): ίδια αποικία και διαφορετικές B' ανανεώσεις (n=15x3) (μπλε), (T): από ίδια αποικία και ίδια B' ανανέωση (τεχνική επανάληψη) (n=15x3) (γκρι).

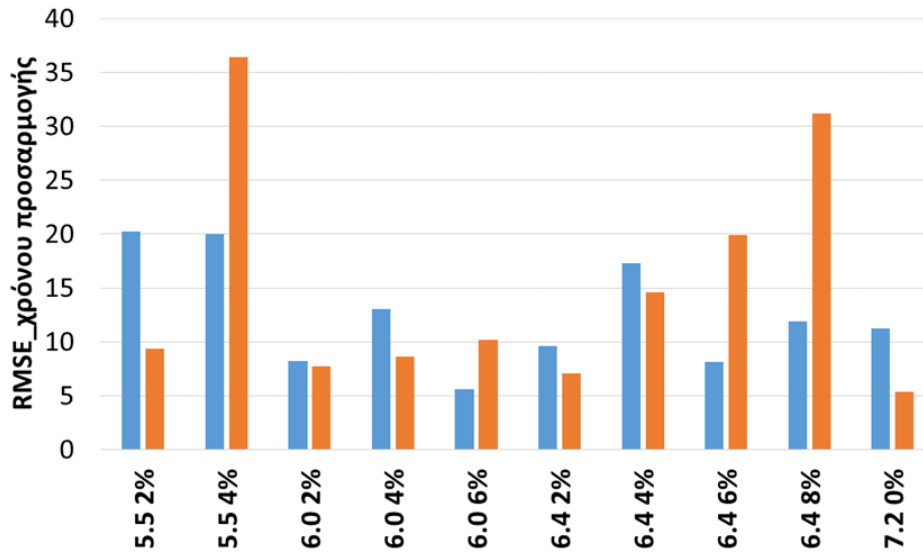


Σχήμα 3.9 Διαγραμματική απεικόνιση της βιολογικής (μπλε) και πειραματικής (πορτοκαλί) παραλλακτικότητας του log ρυθμού ανάπτυξης (log growth rate-log g.r) για τις υποθανάτιες συνθήκες συντήρησης, (pH 5.0-7.2 & NaCl 0-10%, 7°C). Ως μέτρο παραλλακτικότητας χρησιμοποιήθηκε η Ρίζα του Μέσου Τετραγώνου του Σφάλματος (Root Mean Squared Error–RMSE), ο υπολογισμός του οποίου έγινε σύμφωνα με τους Ariany et al (2015).

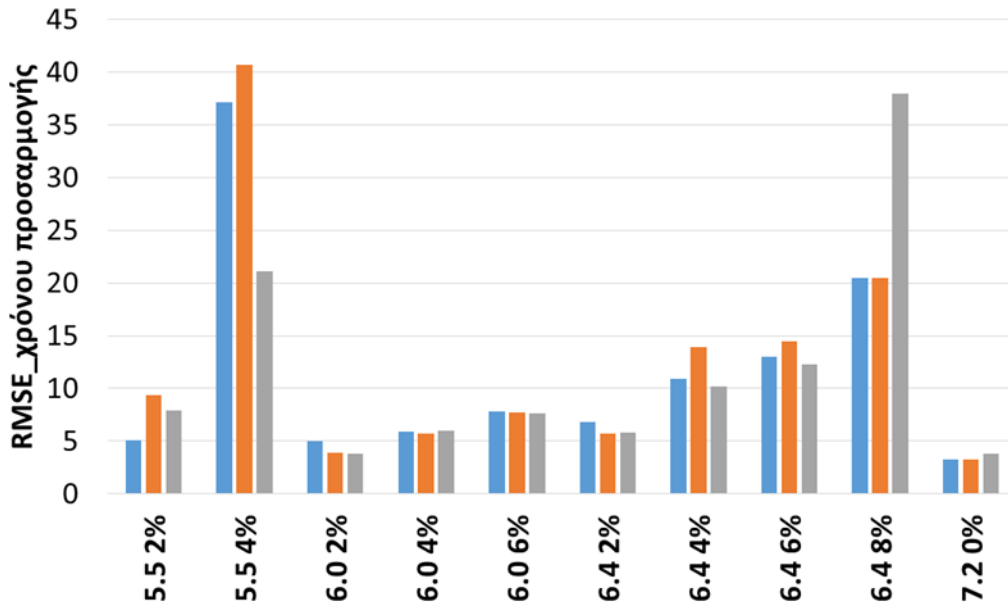


Σχήμα 3.10 Διαγραμματική απεικόνιση της παραλλακτικότητας ανάπτυξης (log ρυθμού ανάπτυξης, log growth rate) του *L. monocytogenes* σε επίπεδο διαφορετικής προέλευσης του εμβολίου, κατά τη συντήρησή του σε υποθανάτιες συνθήκες pH (5.0-7.2) και NaCl (0-10% w/v) και θερμοκρασία 7°C). Η Ρίζα του Μέσου Τετραγώνου του Σφάλματος (Root Mean Squared Error–RMSE) πειραματικής

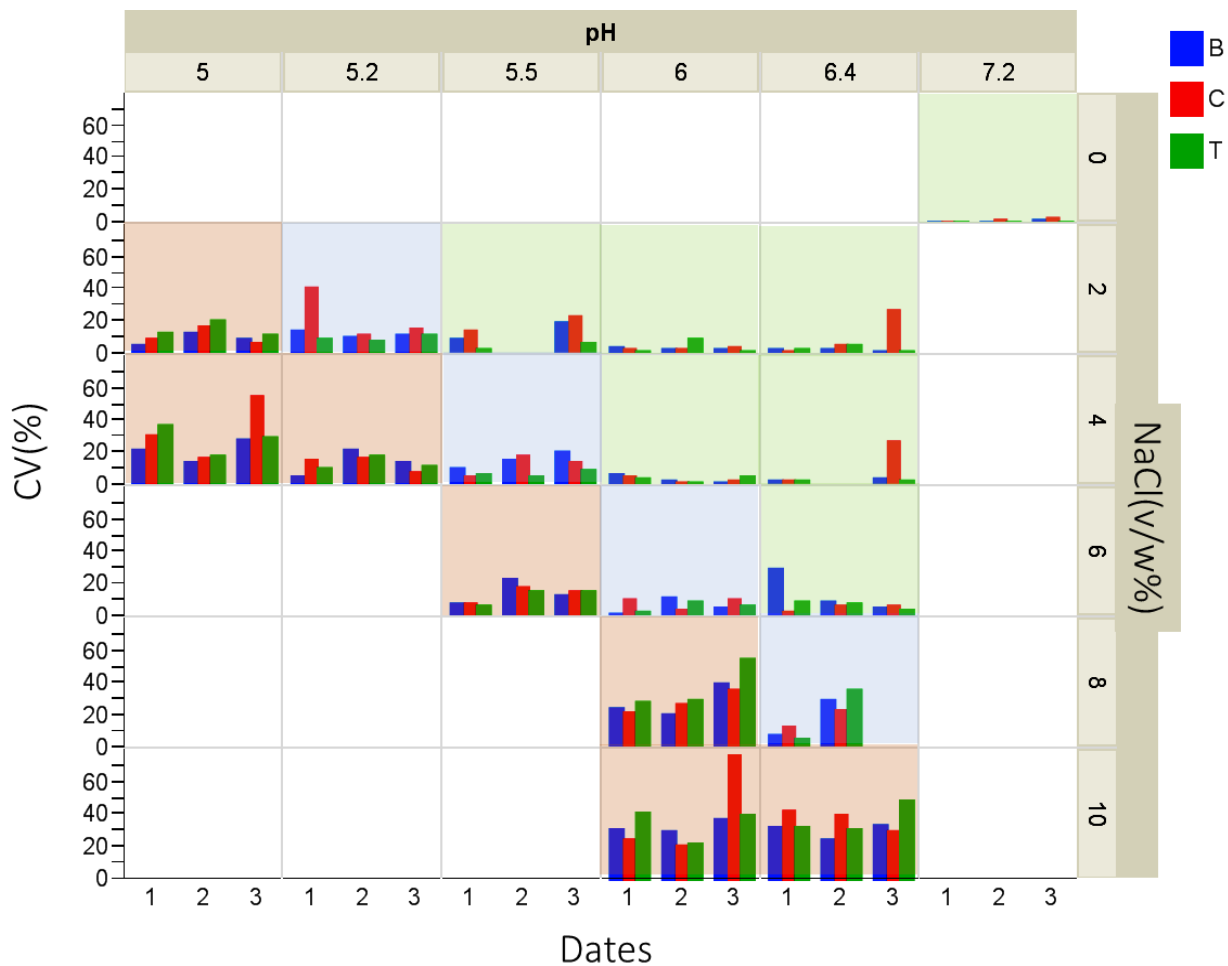
παραλλακτικότητας του εμβαδού υπο της καμπύλης ανάπτυξης για της υποθανάτιες συνθήκες συντήρησης, (pH 5.0-7.2 & NaCl 0-10%, 7°C) που μελετήθηκαν. Τα διαφορετικά εμβόλια προέκυψαν από (C): διαφορετικές αποικίες (n=15x3) (πορτοκαλί), (B): ίδια αποικία και διαφορετικές B' ανανεώσεις (n=15x3) (μπλε), (T): από ίδια αποικία και ίδια B' ανανέωση (τεχνική επανάληψη) (n=15x3) (γκρι).



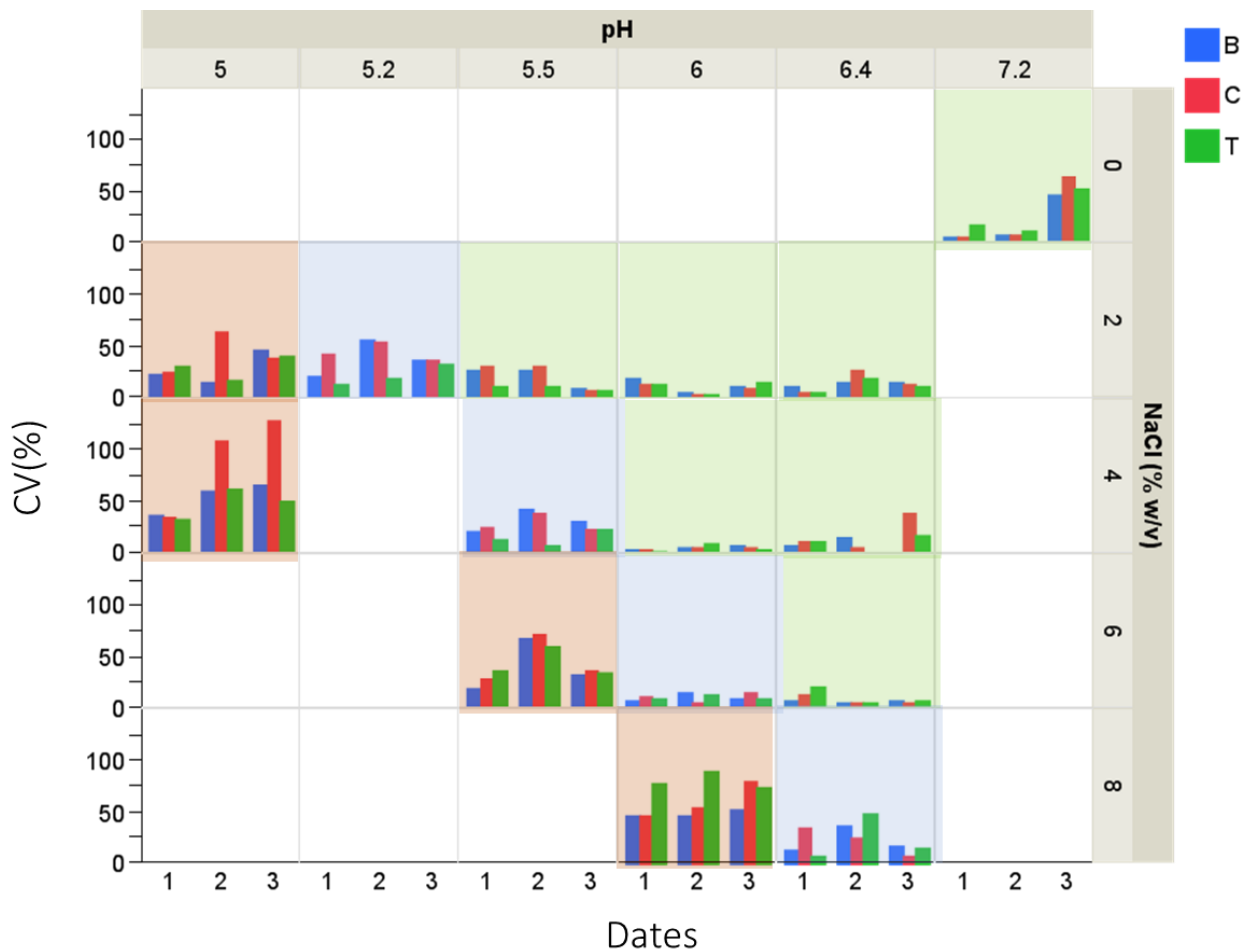
Σχήμα 3.11 Διαγραμματική απεικόνιση της βιολογικής (μπλε) και πειραματικής (πορτοκαλί) παραλλακτικότητας του του χρόνου προσαρμοής (lag time) για τις υποθανάτιες συνθήκες συντήρησης, (pH 5.2-7.2 & NaCl 0-10%, 7°C). Ως μέτρο παραλλακτικότητας χρησιμοποιήθηκε ηΡίζα του Μέσου Τετραγώνου του Σφάλματος (Root Mean Squared Error–RMSE), ο υπολογισμός του οποίου έγινε σύμφωνα με τους Ariany et al (2015).



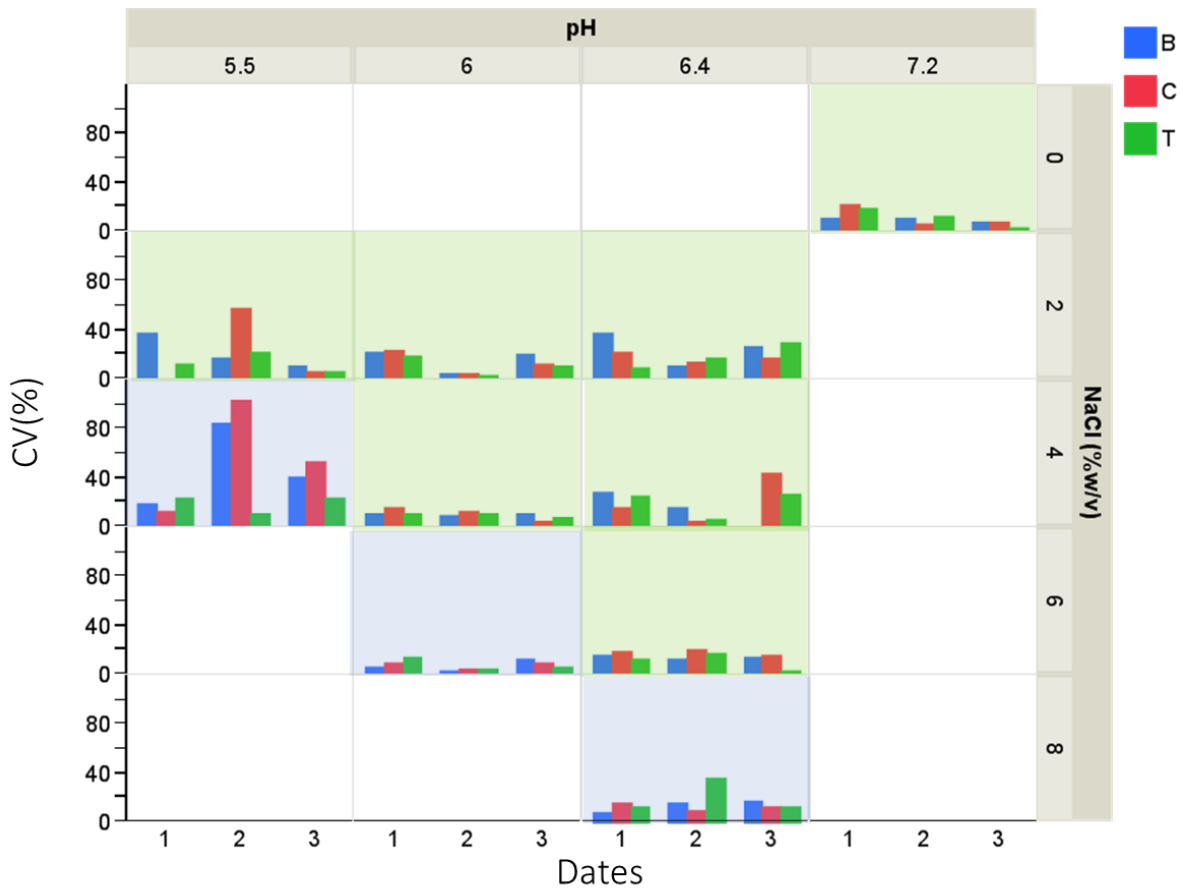
Σχήμα 3.12 Διαγραμματική απεικόνιση της παραλλακτικότητας ανάπτυξης (χρόνου προσαρμογής, lag time) του *L. monocytogenes* σε επίπεδο διαφορετικής προέλευσης του εμβολίου, κατά τη συντήρησή του σε υποθανάτιες συνθήκες pH (5.0-7.2) και NaCl (0-10% w/v) και θερμοκρασία 7°C). Η Ρίζα του Μέσου Τετραγώνου του Σφάλματος (Root Mean Squared Error–RMSE) πειραματικής παραλλακτικότητας του εμβადού υπο της καμπύλης ανάπτυξης για τις υποθανάτιες συνθήκες συντήρησης, (pH 5.0-7.2 & NaCl 0-10%, 7°C) που μελετήθηκαν. Τα διαφορετικά εμβόλια προέκυψαν από (C): διαφορετικές αποικίες (n=15x3) (πορτοκαλί), (B): ίδια αποικία και διαφορετικές B' ανανεώσεις (n=15x3) (μπλε), (T): από ίδια αποικία και ίδια B' ανανέωση (τεχνική επανάληψη) (n=15x3) (γκρι).



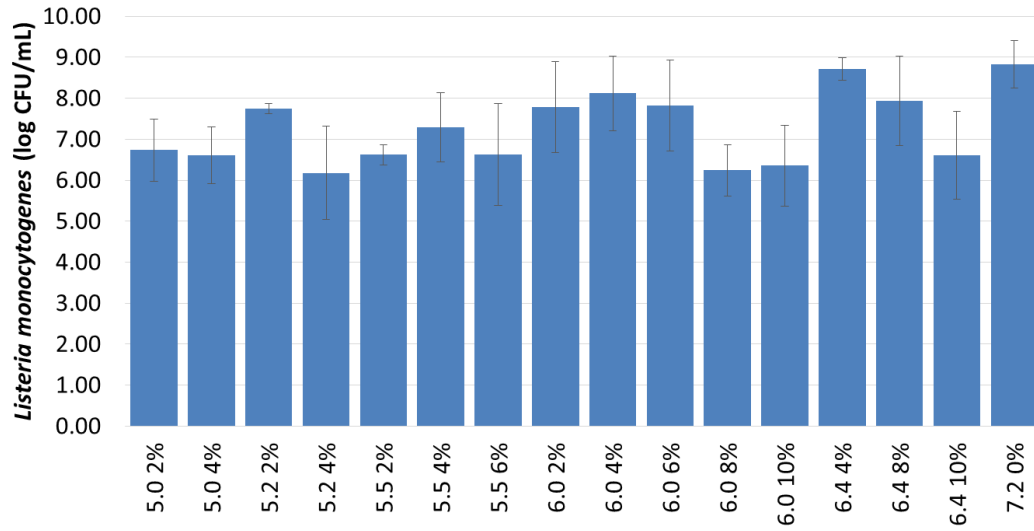
Σχήμα 3.13 Συντελεστής μεταβλητότητας CVareas(%) του εμβადού υπο την καμπίλη ανάπτυξης, σε κάθε συνθήκη συντήρησης ανα τα επίπεδα παραλλακτικότητας που μελετήθηκαν(B,C,T,Dates). (C): εμβόλιο που προήλθε από διαφορετικές αποκίες (n=15), (B): εμβόλιο που προήλθε από διαφορετικές B' ανανεώσεις (n=15), (T): εμβόλιο που προήλθε από αποικία και ίδια B' ανανέωση (τεχνική επανάληψη) (n=15), (Date): ανεξάρτητες επαναλήψεις, σε διαφορετικές ημέρες, ολόκληρου του πειραματικού σχεδιασμού (n=3). Με κόκκινο φόντο σημειώνονται οι συνθήκες που δεν επιτρέπεται ανάπτυξη, με μπλέ φόντο σημειώνονται οι συνθήκες κοντά στα όρια ανάπτυξης-μη ανάπτυξης και με πράσινο φόντο συμβολίζονται οι περιοχές στις οποίες επιτρέπεται ανάπτυξη. (O.D \geq 0.2, 100%)



Σχήμα 3.14 Συντελεστής μεταβλητότητας $CV_{gr}(\%)$ του ρυθμού ανάπτυξης ανα τα επίπεδα παραλλακτικότητας που μελετήθηκαν (B,C,T,Dates). (C): εμβόλιο που προήλθε από διαφορετικές αποικίες ($n=15$), (B): εμβόλιο που προήλθε από διαφορετικές Β' ανανεώσεις ($n=15$), (T): εμβόλιο που προήλθε από αποικία και ίδια Β' ανανέωση (τεχνική επανάληψη) ($n=15$), (Date): ανεξάρτητες επαναλήψεις, σε διαφορετικές ημέρες, ολόκληρου του πειραματικού σχεδιασμού ($n=3$). Με κόκκινο φόντο σημειώνονται οι συνθήκες που δεν επιτρέπεται ανάπτυξη, με μπλέ φόντο σημειώνονται οι συνθήκες κοντά στα όρια ανάπτυξης-μη ανάπτυξης και με πράσινο φόντο συμβολίζονται οι περιοχές στις οποίες επιτρέπεται ανάπτυξη. ($O.D \geq 0.2, 100\%$)



Σχήμα 3.15 Συντελεστής μεταβλητότητας CVμ(%) του χρόνου προσαρμογής ανα τα επίπεδα παραλλακτικότητας που μελετήθηκαν(B,C,T,Dates). (C): εμβόλιο που προήλθε από διαφορετικές αποικίες (n=15), (B): εμβόλιο που προήλθε από διαφορετικές B' ανανεώσεις (n=15), (T): εμβόλιο που προήλθε από αποικία και ίδια B' ανανέωση (τεχνική επανάληψη) (n=15), (Date): ανεξάρτητες επαναλήψεις, σε διαφορετικές ημέρες, ολόκληρου του πειραματικού σχεδιασμού (n=3). Με μπλέ φόντο σημειώνονται οι συνθήκες κοντά στα όρια ανάπτυξης-μη ανάπτυξης και με πράσινο φόντο συμβολίζονται οι περιοχές στις οποίες επιτρέπεται ανάπτυξη. (O.D≥0.2, 100%)



Σχήμα 3.16 Τελικοί πληθυσμοί (log CFU/ mL) του *L. monocytogenes* μετά από 20 ημέρες συντήρησης σε υποθανάτιες συνθήκες pH (5.0-7.2) και NaCl (0-10% w/v) στους 7°C

3.2. Εκτίμηση της επίδρασης ωσμωτικής και όξινης καταπόνησης στην παραλλακτικότητα της οξεοανθεκτικότητας του *L. monocytogenes* έναντι ακραίας όξινης καταπόνησης

Για τη μελέτη της επίδρασης ήπιων συνθηκών ωσμωτικής και όξινης καταπόνησης στην παραλλακτικότητα του τρόπου απόκρισης του *L. monocytogenes* έναντι ακόλουθης ακραίας όξινης καταπόνησης, οι πληθυσμοί του παθογόνου υποβάλλονταν σε όξινη καταπόνηση (37°C, TSBYE pH 2.0, HCl) μετά από 24 h παραμονής στους 7°C σε συνδυασμούς υποθανάτιων συνθηκών pH (4.8-7.2) και NaCl (0-8% w/v) (βλ. Υλικά και Μέθοδοι **Σχήμα 2.6**) κοντά στην περιοχή ανάπτυξης-μη ανάπτυξης. Για την καλύτερη περιγραφή της παραλλακτικότητας χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικής προέλευσης εμβόλια. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε εμβόλιο από α) διαφορετικές αποικίες (C), n=5 και β) ίδια αποικία και διαφορετικές B' ανανεώσεις n=5 (B), ενώ πραγματοποιήθηκαν ανεξάρτητες, σε διαφορετικές ημέρες, ολόκληρου του πειραματικού σχεδιασμού (Dates) (n=3).

Οι καμπύλες απενεργοποίησης του παθογόνου που προέκυψαν από την απεικόνιση των επιβιωσάντων κυττάρων ως προς το χρόνο κατά τη διάρκεια έκθεσής του σε όξινη καταπόνηση δεν ακολουθούν κινητική πρώτου βαθμού αλλά ήταν διφασικής μορφής και επομένως δύναται να περιγραφούν μέσω δύο τιμών D (D1 και D2) που αντιστοιχούν στις δύο «φάσεις» της καμπύλης αντίστοιχα, υποδηλώνοντας την ύπαρξη δύο υποπληθυσμών διαφορετικής οξεοανθεκτικότητας. Έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες η καμπύλη απενεργοποίησης να αποκτώντας μη-γραμμική μορφή ως αποτέλεσμα παρουσίας δύο υποπληθυσμών με διαφορετική απόκριση (Van Boekel, 2002, Cerf, 1977), όπου η παρουσία του ανθεκτικότερου οποίου μπορεί να οδηγήσει σε μετέπειτα υψηλότερο αριθμό επιβιωσάντων κυττάρων από αυτό που αναμένεται μετά από την εφαρμογή διαφορετικών μεθόδων συντήρησης. Το παραπάνω φαινόμενο έχει παρατηρηθεί και από τους Aspidou & Koutsoumanis (2015), όπου ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* εμφάνισε ετερογένεια στην απόκρισή του έναντι ισχυρής όξινης καταπόνησης.

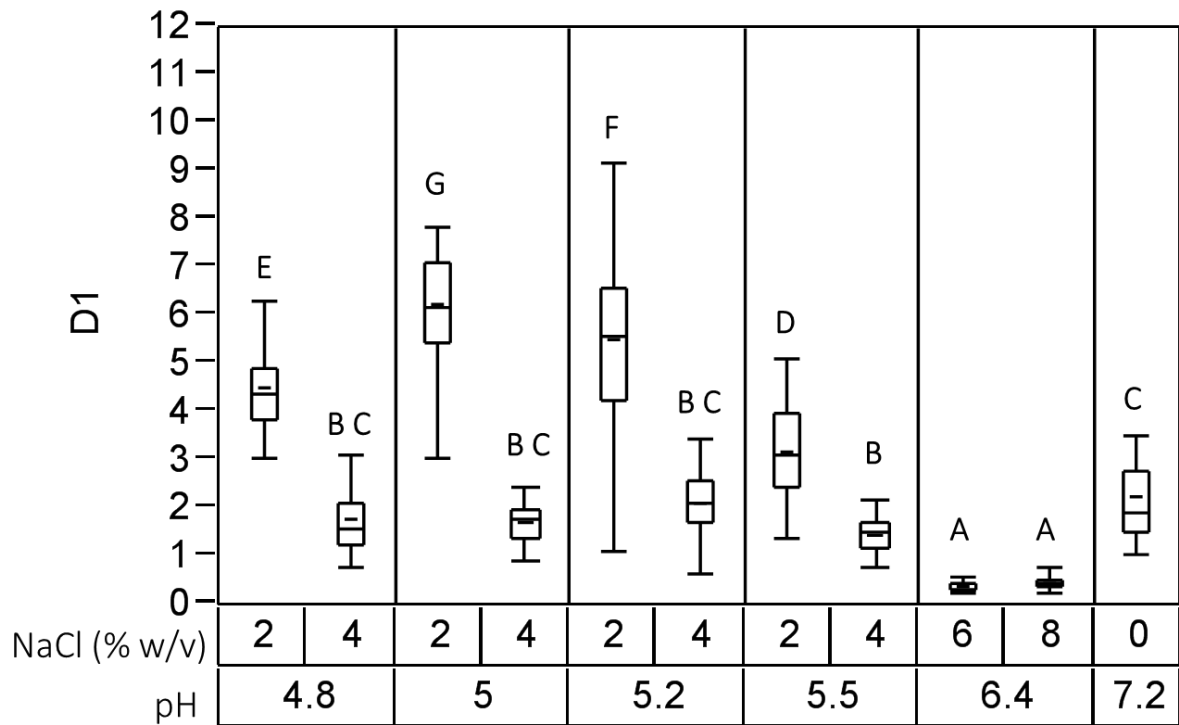
Όσον αφορά στην οξεοανθεκτικότητα του παθογόνου, αυξανόταν μειούμενου του pH και της συγκέντρωσης άλατος, με τους συνδυασμούς pH 5.5-NaCl 2% και pH 5.2 2% NaCl να επάγουν τη μεγαλύτερη οξεοανθεκτικότητα όπως φαίνεται από τις αντίστοιχες τιμές D1_{5.5-2%} (1-5 min), D1_{5.2-2%} (1-11 min) και D2_{5.5-2%} (8-29min), D2_{5.2-2%}, (4-58min) ,ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση της προέλευσης του εμβολίου στην πειραματική παραλλακτικότητα του χρόνου υποδεκαπλασιασμού. Σχετικά με την παράμετρο D2 παρατηρείται ομαδοποίηση των δεδομένων ανάλογα με τα επίπεδα αλατότητας. Πιο συγκεκριμένα παραμονή του *L. monocytogenes* σε NaCl 4% w/v, ανεξαρτήτως pH, είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση παρόμοιων τιμών D2 ($P>0.05$) με το pH 7.2 , οι οποίες διέφεραν στατιστικώς σημαντικά ($P<0.05$) από εκείνες των συνθηκών χαμηλής αλατότητας (NaCl 2% w/v). Παραμονή δε σε ήπιες συνθήκες ωσμωτικής καταπόνησης NaCl 2% w/v είχε ως αποτέλεσμα τη στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση των D1 τιμών, ανάλογα με την ένταση της ήπιας όξινης καταπόνησης, με το pH 5.0 να επάγει την υψηλότερη οξεοανθεκτικότητα (D1=1-10 min) (**Σχήμα 3.17-18**).

Η παράμετρος D2 που χαρακτηρίζει τον οξεοανθεκτικότερο, εναπομείναντα υποπληθυσμό παρουσιάζει μεγαλύτερη παραλλακτικότητα στην κατανομή των τιμών της ανά συνθήκη (pH-NaCl) όπως φαίνεται στο **Σχήμα 3.17-18** αλλά και σύμφωνα με το δείκτη RMSE ο οποίος είναι υψηλότερος για την παράμετρο D2 (3.0-9.8) σε σχέση με την D1 (0.2-1.77) όπως φαίνεται αναλυτικά στο (**Σχήμα 3.21-22**) υποδεικνύοντας ότι είναι πιο χαρακτηριστική παράμετρος της καμπύλης απενεργοποίησης. Πιο συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη παραλλακτικότητα στον τρόπο απόκρισης του παθογόνου έναντι χαμηλού pH παρατηρείται στις συνθήκες με pH 5.0-5.2 και χαμηλή αλατότητα (2% w/v) (D2_{5.0-2%} 8.95-51.65min, D2_{5.2-2%} 4.03-58.12min.), όπως αποδεικνύεται από το CV που κυμαίνεται από 30-35% και 57-60% για D1 και D2 αντίστοιχα. Οι παραπάνω συνδυασμοί pH-NaCl, δε, αντιστοιχούν σε συνθήκες που επάγουν μηχανισμούς οξεοανθεκτικότητας. Συγκεντρωτικά τα επίπεδα πειραματικής παραλλακτικότητας (CV, RMSE) στην οξεοανθεκτικότητα για τις παραπάνω συνθήκες, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. (**Πίνακας 3.2**)

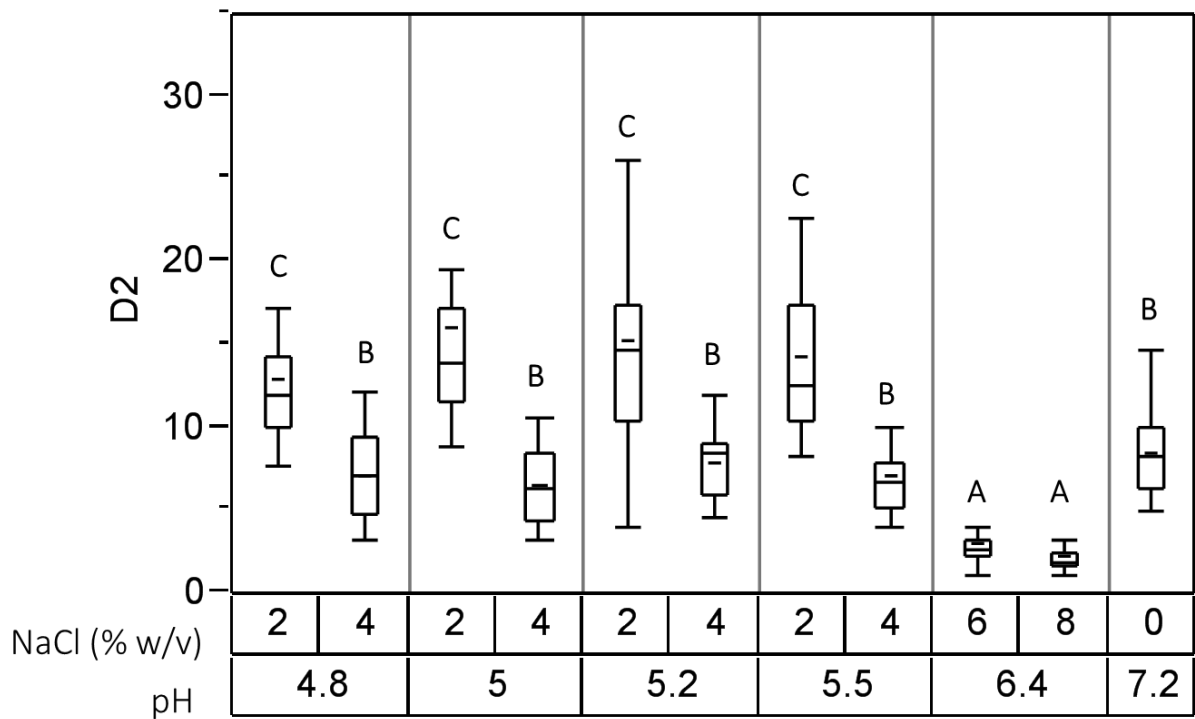
Πίνακας 3.2 Πειραματική παραλλακτικότητα της οξεοανθεκτικότητας του *L. monocytogenes* μετά από παραμονή σε συνθήκες pH και NaCl σε θερμοκρασία 7°C έναντι μετέπειτα όξινης καταπόνησης.

<i>pH</i> & <i>NaCl</i>	<i>D1(min)</i>	<i>D2(min)</i>	<i>Μέσος όρος</i>		<i>CV(%)_{D1}</i>	<i>CV(%)_{D2}</i>	<i>RMSE_{D1}</i>	<i>RMSE_{D2}</i>
			<i>D1(min)</i>	<i>D2(min)</i>				
4.8 2%	3.07-6.86	7.83-33.26	4.39	12.01	21.17	36.19	0.72	5.29
5.0 2%	1.78-11.51	8.95-51.65	6.25	16.1	29.14	57.74	1.77	8.26
5.2 2%	1.15-10.60	4.03-58.12	5.54	15.4	35.69	60.46	0.50	9.89
5.5 2%	1.38-5.11	8.26-29.21	3.20	14.38	28.51	35.00	0.66	4.61
5.5 4%	0.82-2.20	4.12- 9.12	1.48	7.12	25.10	39.83	0.28	3.08

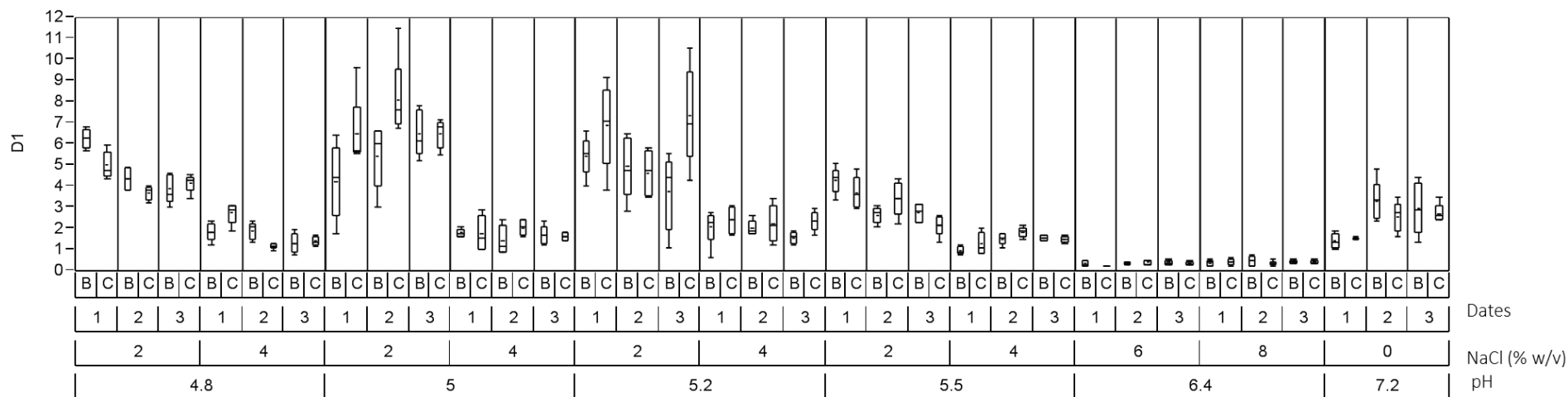
Η παραλλακτικότητα στην απόκριση ακολουθεί την ισχύ της καταπόνησης, με τις συνθήκες $pH > 5.5$ και $NaCl \geq 4\%$ όπου το ακραίο pH (2.0) λειτουργεί καθοριστικά στην απενεργοποίηση του πληθυσμού, χωρίς την ενεργοποίηση μηχανισμών οξεοανθεκτικότητας από προηγούμενη έκθεση (24h, 7°C), η παραλλακτικότητα να μειώνεται. Ενώ η παραμονή σε συνθήκες $pH < 5.5$ και $NaCl 2\%$ που αντιστοιχούν κοντά στην περιοχή ανάπτυξης-μη ανάπτυξης αλλά και όπως είναι γνωστό επάγουν μηχανισμούς οξεοανθεκτικότητας αυξάνει την παραλλακτικότητα στην ικανότητα απόκρισης του μικροοργανισμού έναντι ακόλουθης ακραίας όξινης καταπόνησης Τα αποτελέσματα συγκλίνουν με αυτά της προηγούμενης μελέτης των Makariti et al. (2015) στην οποία φάνηκε ότι η συντήρηση σε ήπιες όξινες συνθήκες επάγει μηχανισμούς οξεοανθεκτικότητας, με συνέπεια τη μεγαλύτερη επιβίωσή της έναντι ακόλουθης όξινης καταπόνησης, όμως με παράλληλη εμφάνιση παραλλακτικότητας μεταξύ των επαναλήψεων (n=4) που πραγματοποιήθηκαν, ως προς τον χρόνο επιβίωσης του πληθυσμού παρουσία όξινων συνθηκών .όπως φαίνεται από τις υψηλές τυπικές αποκλίσεις.



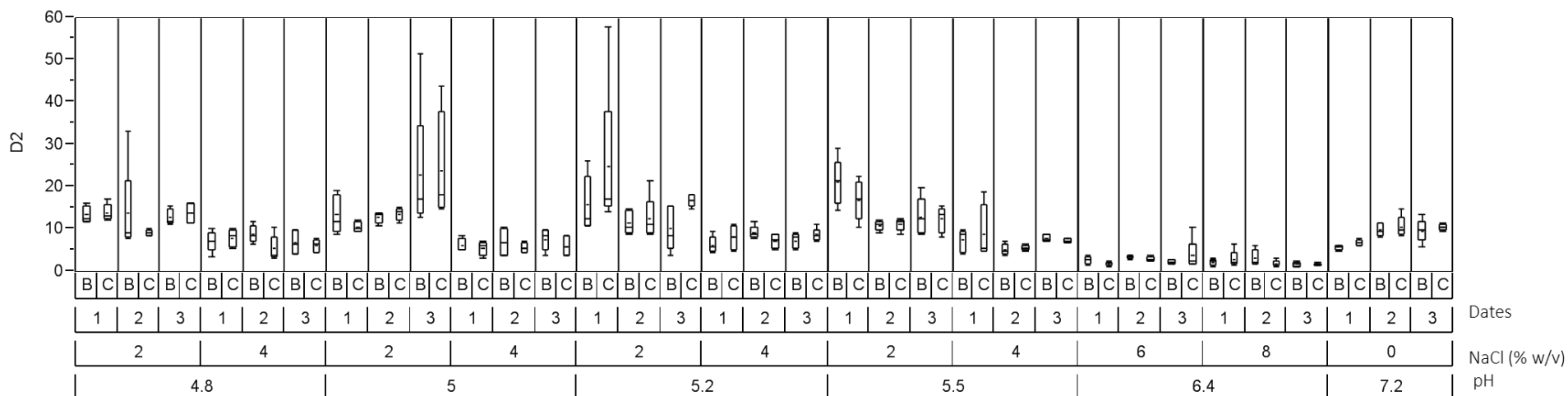
Σχήμα 3.17 Χρόνος υποδεκαπλασιασμού D1 (min) κατά την υποβολή σε όξινη καταπόνηση HCl (pH 2.0) μετά από συντήρηση 24h στους 7°C παρουσία διάφορων συνδυασμών τιμών pH και άλατος όπως αναφέρονται στο γράφημα. Σημαντικές διαφορές ($P < 0.05$) σημειώνονται στις περιπτώσεις που δεν μοιράζονται ίδιο γράμμα.



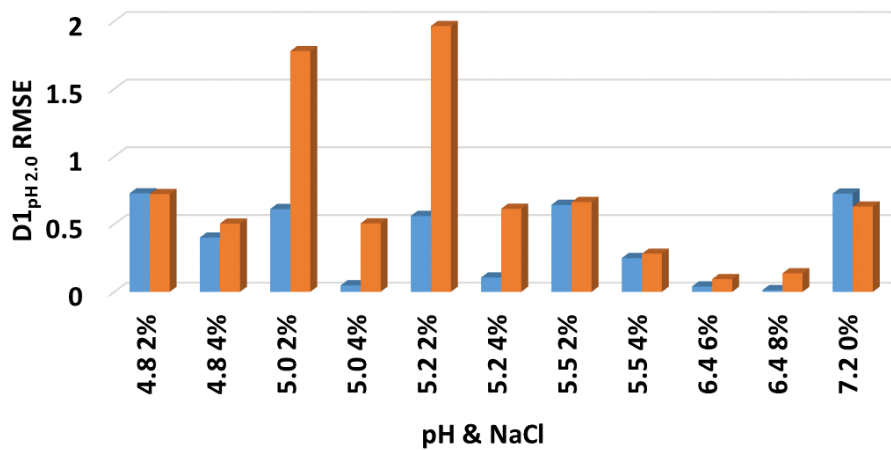
Σχήμα 3.18 Χρόνος υποδεκαπλασιασμού D1 (min) κατά την υποβολή σε όξινη καταπόνηση HCl (pH 2.0) μετά από συντήρηση 24h στους 7°C παρουσία διάφορων συνδυασμών τιμών pH και άλατος όπως αναφέρονται στο γράφημα. Σημαντικές διαφορές ($P < 0.05$) σημειώνονται στις περιπτώσεις που δεν μοιράζονται ίδιο γράμμα.



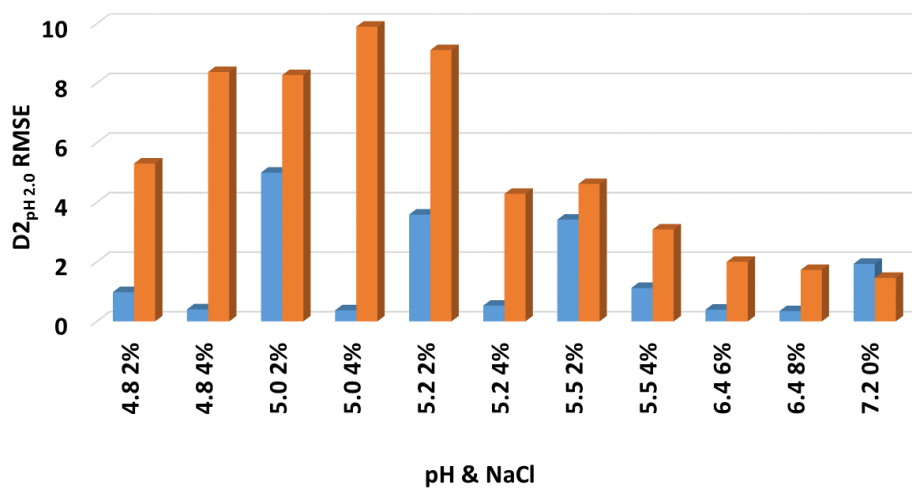
Σχήμα 3.19 Χρόνος υποδεκαπλασιασμού D1 (min) κατά την υποβολή σε όξινη καταπόνηση HCl (pH 2.0) μετά από συντήρηση 24h στους 7oC παρουσία διάφορων συνδυασμών τιμών pH και άλατος όπως αναφέρονται στο γράφημα. (C): εμβόλιο που προήλθε από διαφορετικές αποκίες (n=5), (B): εμβόλιο που προήλθε από διαφορετικές B' ανανεώσεις (n=5), Date: ανεξάρτητες επαναλήψεις σε διαφορετικές ημέρες, ολόκληρου του πειραματικού σχεδιασμού (n=3)



Σχήμα 3.20 Χρόνος υποδεκαπλασιασμού D2 (min) κατά την υποβολή σε όξινη καταπόνηση HCl (pH 2.0) μετά από συντήρηση 24h στους 7°C παρουσία διάφορων συνδυασμών τιμών pH και άλατος όπως αναφέρονται στο γράφημα. (C): εμβόλιο που προήλθε από διαφορετικές αποκίες (n=5), (B): εμβόλιο που προήλθε από διαφορετικές B' ανανεώσεις (n=5), Date: ανεξάρτητες επαναλήψεις σε διαφορετικές ημέρες, ολόκληρου του πειραματικού σχεδιασμού (n=3)



Σχήμα 3.21 Διαγραμματική απεικόνιση της βιολογικής (μπλε) και πειραματικής (πορτοκαλί) παραλλακτικότητας τοπ χρόνου υποδεκαπλασιασμού D1 για τις υποθανάτιες συνθήκες συντήρησης, (pH 4.8-7.2 & NaCl 0-8%, 7°C). Ως μέτρο παραλλακτικότητας χρησιμοποιήθηκε ηΡίζα του Μέσου Τετραγώνου του Σφάλματος (Root Mean Squared Error–RMSE), ο υπολογισμός του οποίου έγινε σύμφωνα με τους Ariany et al (2015).



Σχήμα 3.22 Διαγραμματική απεικόνιση της βιολογικής (μπλε) και πειραματικής (πορτοκαλί) παραλλακτικότητας τοπ χρόνου υποδεκαπλασιασμού D2 για τις υποθανάτιες συνθήκες συντήρησης, (pH 4.8-7.2 & NaCl 0-8%, 7°C). Ως μέτρο παραλλακτικότητας χρησιμοποιήθηκε ηΡίζα του Μέσου Τετραγώνου του Σφάλματος (Root Mean Squared Error–RMSE), ο υπολογισμός του οποίου έγινε σύμφωνα με τους Ariany et al (2015).

3.3. Εκτίμηση της παραλλακτικότητας των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *gad2*, *sigB*, *rpoB* και *prfA* κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε οριακές για την ανάπτυξη συνθήκες pH και NaCl

Με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση παραμονής του *Listeria monocytogenes* σε υποθανάτιες συνθήκες όξινης και ωσμωτικής καταπόνησης στην παραλλακτικότητα της γονιδιακής έκφρασης, εκτιμήθηκε η μεταβολή των επιπέδων μεταγραφής γονιδίων που σχετίζονται με μηχανισμούς προσαρμογής και αντιμετώπισης συνθηκών όξινης καταπόνησης (*gad2*, *sigB*) καθώς και με τη λοιμωξιογόνο δράση (*prfA*) του παθογόνου.

Η γονιδιακή ρύθμιση είναι μια στοχαστική λειτουργία του κυττάρου που δημιουργεί παραλλακτικότητα και στο φαινότυπο εμφανίζοντας διαφορετικές αποκρίσεις σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων. Επιπλέον μελέτες έχουν υποδείξει στοχαστική συμπεριφορά στην ανάπτυξη βακτηρίων μελετώντας την στοχαστικότητα στην γονιδιακή ρύθμιση ως πηγή της φαινοτυπικής ετερογένειας (Kiviet et al. 2014). Η στοχαστικότητα στην γονιδιακή έκφραση έχει σημαντικό αντίκτυπο στην κυτταρική λειτουργία καθορίζοντας την ικανότητα επιβίωσης σε καταστάσεις όπως απόκριση σε καταπονήσεις και παθογένεια (Raj & Oudenaarden, 2012). Για αυτό για την μελέτη σχετικών επιπέδων έκφρασης επιλέχθηκαν οι συνδυασμοί συνθηκών pH και NaCl οι οποίες α) επιτρέπουν ανάπτυξη και χαρακτηρίζονται από μεγάλη παραλλακτικότητα τόσο στην ικανότητα ανάπτυξης (pH 5.5 2% w/v NaCl), όσο και στην οξεοανθεκτικότητα έναντι ακόλουθης ακραίας όξινης καταπόνησης β) επιτρέπουν οριακά ανάπτυξη (pH 5.2 2% w/v NaCl) και χαρακτηρίζονται από μεγάλη παραλλακτικότητα στην ικανότητα ανάπτυξης, αλλά αναπτύσσουν υψηλή οξεοανθεκτικότητα (μεγάλης παραλλακτικότητας) έναντι ακόλουθης ακραίας όξινης καταπόνησης γ) επιτρέπουν ανάπτυξη και χαρακτηρίζονται από μεγάλη παραλλακτικότητα στην ικανότητα ανάπτυξης (pH 6.4 8% w/v NaCl), αλλά παρουσιάζουν χαμηλή οξεοανθεκτικότητα (και μικρή παραλλακτικότητα) έναντι ακόλουθης ακραίας όξινης καταπόνησης δ) συνθήκες που δεν επιτρέπουν ανάπτυξη (σύμφωνα με το όριο ανάπτυξης $OD \geq 0.2$) και επομένως χαρακτηρίζονται από μικρή παραλλακτικότητα στην ικανότητα ανάπτυξης (pH 5.0 2% w/v NaCl), εντούτοις όμως αναπτύσσουν υψηλή οξεοανθεκτικότητα (μεγάλης παραλλακτικότητας) έναντι

ακόλουθης ακραίας όξινης καταπόνησης και ε) συνθήκες που είναι βέλτιστες για την ανάπτυξης του μικροοργανισμού pH (7.2 0% w/v NaCl).

Το εμβόλιο του *L. monocytogenes* που χρησιμοποιήθηκε προήλθε από διαφορετικές αποικίες (C) (πειραματικές επαναλήψεις) (n=5), ενώ πραγματοποιήθηκαν τρεις (3) ανεξάρτητες επαναλήψεις, σε διαφορετικές ημέρες, ολόκληρου του πειραματικού σχεδιασμού (βιολογική επανάληψη) (Dates) (n=3). Ο πειραματικός σχεδιασμός περιελάμβανε μόνο διαφορετικές αποικίες για τον ανεξάρτητο εμβολιασμό των πειραματικών επαναλήψεων την εκάστοτε βιολογική επανάληψη, με σκοπό να συμπεριληφθεί η διαποικιακή και βιολογική παραλλακτικότητα και την παραλαβή τελικά όλων των δυνατών αποκρίσεων του μικροοργανισμού (σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης) και συνεπώς την καλύτερη περιγραφή της παραλλακτικότητας της γονιδιακής έκφρασης

Για την εκτίμηση της σχετικής έκφρασης των παραπάνω γονιδίων χρησιμοποιήθηκε η PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR) και η ανίχνευση των παραγόμενων προϊόντων γινόταν με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green I. Το *16SrRNA* και το *proB* χρησιμοποιήθηκαν ως γονίδια αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Το σύνολο των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν βρέθηκαν βιβλιογραφικά και τα χαρακτηριστικά τους φαίνονται στον **Πίνακα.2.4**. Για την εκτίμηση της μεταβολής των επιπέδων γονιδιακής μεταγραφής μεταξύ διαφορετικών συνθηκών χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση-μοντέλο του Pfaffl (Pfaffl, 2004) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως προς τη συνθήκη «μάρτυρα», δηλαδή TSBYE pH 7.2, χωρίς επιπλέον προσθήκη άλατος, την ημέρα του εμβολιασμού (μηδενική ημέρα πειράματος).

Όσον αφορά στην έκφραση του γονιδίου, *gad2* παρατηρείται θετική μεταβολή των επιπέδων μεταγραφής του μετά από παραμονή του παθογόνου για 24 h (7°C) σε όλες τις υπό μελέτη συνθήκες συντήρησης εκτός από τη συνθήκη pH 7.2 (χωρίς επιπλέον NaCl). Η μέγιστη μεταβολή στα επίπεδα μεταγραφής του *gad2* ($100 \leq FC \leq 1500$) παρατηρήθηκε σε pH 5.0-5.5 και 2% w/v NaCl, (**Σχήμα 3.23**), συνθήκες στις παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη οξεοανθεκτικότητα έναντι μετέπειτα όξινης καταπόνησης (pH 2.0) όπως αποδεικνύεται από του υψηλούς χρόνους υποδεκαπλασιασμού D1max (11 min) και D2max (60min). Επιπλέον, οι προαναφερθείσες συνθήκες είναι αυτές που παρουσιάζουν και τα υψηλότερα επίπεδα

παραλλακτικότητας με μεγάλο εύρος τιμών Folds Change (Σχήμα 3.23), όπως φαίνεται και από τον αντίστοιχο συντελεστή $RMSE_{FC}$ (2.0-2.69) (Σχήμα 3.24) σε αντίθεση με το pH 7.2, όπου ο $RMSE_{FC} < 0.3$. (Πίνακας 3.3)

Πίνακας 3.3 Εκτίμηση πειραματικής παραλλακτικότητας σε επίπεδο α) σχετικής μεταβολής των επιπέδων έκφρασης του *gad2* ($RMSE_{FC}$) και β) οξεοανθεκτικότητας ($RMSE_{D1}$, $RMSE_{D2}$) για τις συνθήκες που παρουσίασαν μεγαλύτερη παραλλακτικότητα στην γονιδιακή ρύθμιση.

<i>pH&NaCl</i>	<i>Folds Change_{gad2}</i>	<i>RMSE_{FC}</i>	<i>D1(min)</i>	<i>D2(min)</i>	<i>RMSE_{D1}</i>	<i>RMSE_{D2}</i>
5.0 2%	118.24-1146.71	2.69	1.78-11.51	8.95-51.65	1.77	8.26
5.2 2%	244.99-1475.02	2.08	1.15-10.60	4.03-58.12	0.50	9.89
5.5 2%	190.45-1063.53	2.78	1.38-5.11	8.26-29.21	0.66	4.61

Παραμονή του παθογόνου σε pH 6.4 και 8% w/v NaCl είχε ως αποτέλεσμα τη θετική ρύθμιση του *gad2*, όμως η μεταβολή των επιπέδων μεταγραφής του παρέμεινε χαμηλότερη ($FC_{6.4\ 8\%}$ 26.48-552.66) από αυτήν των pH 5.0-5.2, ενώ η παραλλακτικότητα των επιπέδων μεταγραφής παρέμεινε σε σχετικά υψηλά επίπεδα $RMSE_{FC}$ 2.0. Τα χαμηλότερα επίπεδα μεταγραφής του *gad2*, συνάδουν με τη μειωμένη ικανότητα επιβίωσης του παθογόνου έναντι ακόλουθης έκθεσης σε ακραίο pH ($D1_{6.4\ 8\%}$ 0.24-0.77, $D2_{6.4\ 8\%}$ 1.18-6.66). Αυτό δύναται να οφείλεται στην επίδραση της ωσμωτικής καταπόνησης, λόγω της παρουσίας άλατος (8 % w/v) που φαίνεται να λειτουργεί καθοριστικά στην γρήγορη θανάτωση του μικροβιακού πληθυσμού έναντι μετέπειτα ακραίου pH, παρά την ενεργοποίηση των μηχανισμών οξεοανθεκτικότητας.

Το γονίδιο *gad2* (glutamate decarboxylase 2) κωδικοποιεί το ένζυμο αποκαρβοξυλάση του γλουταμινικού όξέος και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση συνθηκών όξινης καταπόνησης (Karatzas et al., 2012) αλλά και στους μηχανισμούς προσαρμογής σε ήπιες όξινες συνθήκες σε στελέχη του *L. monocytogenes* που απουσιάζει το *gad1* όπως το C5, δεδομένου ότι ανήκει στον ορότυπο 4b. (Cotter et al., 2001). Τα παραπάνω συμφωνούν με την τάση στα σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *gad2* που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη. Η

θετική ρύθμιση του *gad2* με την ταυτόχρονη εμφάνιση δια-αποικιακής και βιολογικής παραλλακτικότητας σε επίπεδο έκφρασης συνδέεται με την τάση της απόκρισης αλλά και της παραλλακτικότητας σε φαινοτυπικό επίπεδο, στις συνθήκες 5.0 2%, 5.2 2% στην ικανότητα επιβίωσης σε όξινη καταπόνηση και στην συνθήκη 5.5 2% ως προς την ικανότητα επιβίωσης αλλά και ανάπτυξης.

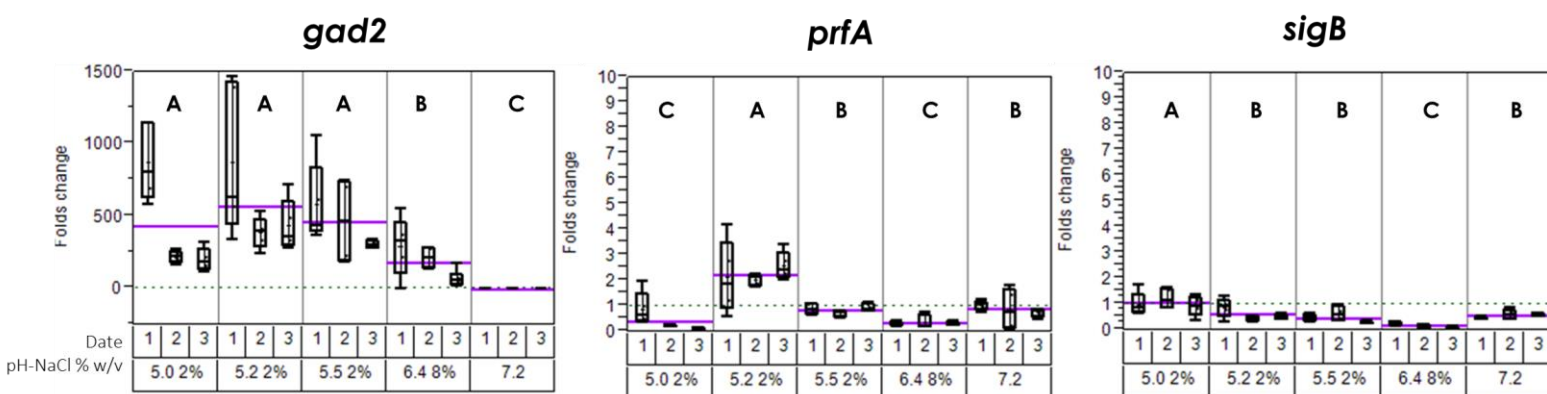
Όσον αφορά το *prfA*, παραμονή του παθογόνου σε συνθήκες ήπιας ωσμωτικής και όξινης καταπόνησης για 24 h (7°C) δεν οδήγησε σε μεταβολή των επιπέδων έκφρασής του. Εξαιρέση αποτελεί το pH 5.2 2%, w/v, παραμονή του παθογόνου στο οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή των επιπέδων μεταγραφής του ($FC_{5.2-2\%}$ 0.60-4.22) και εμφάνιση παραλλακτικότητας καθώς τοποθετείται στα όρια έκφρασης-μη έκφρασης (μεταβολή επιπέδων έκφρασης όπου $FC \geq 1$) με ορισμένα δείγματα να δίνουν αρνητική ρύθμιση ενώ άλλα θετική με το 67% των δειγμάτων να έχουν $FC_{5.2-2\%} \geq 2$.

Το γονίδιο *prfA* που κωδικοποιεί τον ρυθμιστικό παράγοντα *prfA* που συμβάλλει στην επαγωγή πολλών μηχανισμών παθογένειας (Joseph et al., 2006, Chatterjee et al., 2006, Scotti et al., 2007) σύμφωνα με την προηγούμενη μελέτη των Makariti et al., (2015) τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν σε παρατεταμένη συντήρηση του *L. monocytogenes* στους 7°C με μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης στις συνθήκες με $pH \leq 5.5$ και χαμηλή αλατότητα. Αυτή η τάση στα επίπεδα έκφρασης φαίνεται και στη παρούσα μελέτη με το γονίδιο *prfA* να παρουσιάζει σε 24h συντήρησης θετική ρύθμιση στη συνθήκη 5.2 2% w/v NaCl, η οποία παραλλάσει αρκετά σε αποικιακό επίπεδο.

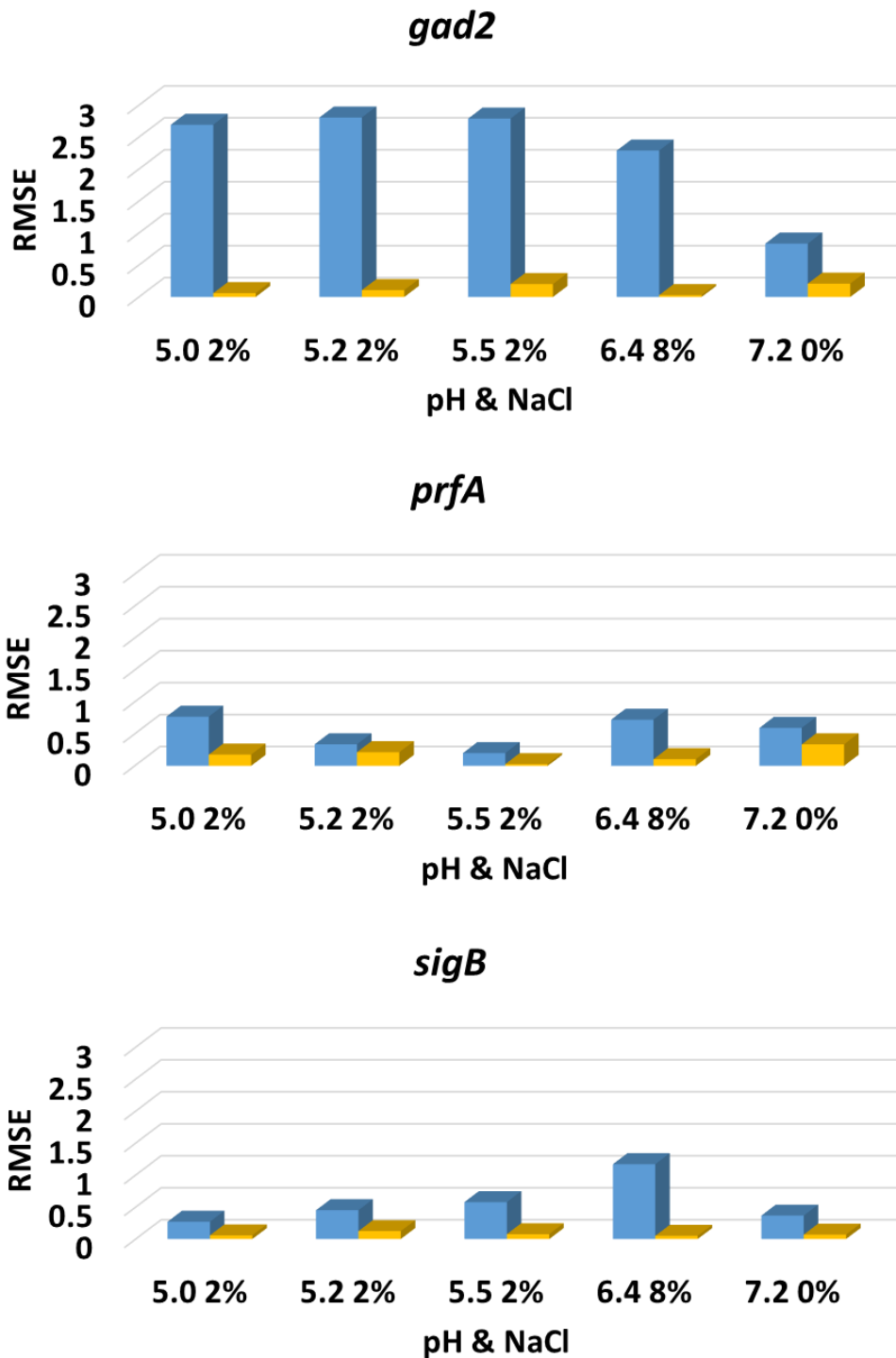
Όσον αφορά στο γονίδιο *sigB*, παρατηρείται αρνητική ρύθμιση σε όλες τις συνθήκες συντήρησης (pH-NaCl) εκτός από τον συνδυασμό pH 5.0 2% NaCl, όπου τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου παραμένουν σταθερά ή να μειώνονται ($FC_{5.0-2\%}$ 0.40-1.80) με μόνο το 10% των παρατηρήσεων να υπερβαίνουν οριακά το όριο θετικής μεταβολής επιπέδων έκφρασης $FC=1$.

Το γονίδιο *sigB* κωδικοποιεί τον ρυθμιστικό παράγοντα σ^B που συμβάλλει στην επαγωγή μηχανισμών λοιμοξιογόνου δράσης (Kazmierczak et al., 2006, 2003) αλλά και όξεοανθεκτικότητας μέσω ενεργοποίησης του συστήματος GAD το οποίο διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του *L. monocytogenes* σε περιβάλλον με χαμηλό pH (Cotter et al., 2001b). Στην παρούσα μελέτη δεν

παρατηρήθηκε επαγωγή του *sigB* μετά από 24 ώρες συντήρησης στους 7°C στις συνθήκες (pH-NaCl) ήπιας ωσμωτικής και όξινης καταπόνησης όπου μελετήθηκαν, αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα των Makariti et al., (2015) που ανέφεραν ότι θετική ρύθμιση του *sigB* παρατηρήθηκε μετά την 6η ημέρα συντήρησης στις συνθήκες με pH>5.2 και NaCl≤4%. Επομένως η αύξηση των επιπέδων έκφρασης του *gad2* που παρατηρείται στις συνθήκες που μελετήθηκαν είναι ανεξάρτητη από το σύστημα ρύθμισης του *sigB*. Όπως αναφέρεται και από τους Ferreira et al., (2001) ο *L. monocytogenes* διαθέτει μηχανισμούς επαγωγής ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση (ATR) εξαρτώμενους αλλά και ανεξάρτητους από τη ρύθμιση του *sigB*



Σχήμα 3.23 Σχετική μεταβολή των επιπέδων των γονιδίων *gad2*, *sigB*, και *prfA* μετά από συντήρηση για 24 h (7°C) σε συνθήκες ωσμωτικής και όξινης καταπόνησης όπως υπολογίστηκε με το μοντέλο του Pfaffl για κάθε συνδυασμό pH-NaCl. Το ενδογενές γονίδιο αναφοράς 16SrRNA χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Σημαντικές διαφορές (P<0.05) σημειώνονται στις περιπτώσεις που δεν μοιράζονται ίδιο γράμμα.



Σχήμα 3.24 Διαγραμματική απεικόνιση της βιολογικής (μπλε) και πειραματικής (κίτρινο) παραλλακτικότητας για τα επίπεδα σχετικής μεταβολής έκφρασης των γονιδίων *gad2*, *sigB*, και *prfA*, σε κάθε συνθήκη συντήρησης pH(5.0-7.2) NaCl (0-8%w/V) στους 7°C για 24h. Ως μέτρο παραλλακτικότητας χρησιμοποιήθηκε η ρίζα του Μέσου Τετραγώνου του Σφάλματος (Root Mean Squared Error–RMSE), ο υπολογισμός του οποίου έγινε σύμφωνα με τους Ariany et al (2015).

4.Συμπεράσματα

Η ύπαρξη διακυτταρικών διακυμάνσεων στο φαινότυπο και στο μηχανισμό γονιδιακής ρύθμισης ενός γενετικά πανομοιότυπου πληθυσμού σε συνθήκες καταπόνησης έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ετερογένειας στην απόκριση του μικροοργανισμού και συνεπώς αποτελούν φαινόμενα τα οποία δύνανται να περιγραφούν στοχαστικά.

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η παραμονή του παθογόνου σε συνθήκες οριακές για την ανάπτυξη του έχουν ως αποτέλεσμα αυξημένη ετερογένεια στην απόκρισή του τόσο σε φαινοτυπικό επίπεδο, όσο και σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης ενώ οι υποθανάτιες συνθήκες καταπόνησης (pH και NaCl) και όχι η προετοιμασία του εμβολίου συμβάλλουν στην παραλλακτικότητα της απόκρισης του μικροοργανισμού. Οι συνδυασμοί αλατότητας και μειωμένου pH που αποτελούν οριακές για την ανάπτυξη του παθογόνου συνθήκες είναι αυτές που προκαλούν την μεγαλύτερη παραλλακτικότητα ως προς την ικανότητα ανάπτυξης του. Επιπλέον, η έκθεση του παθογόνου σε ήπιες συνθήκες καταπόνησης (pH-NaCl % w/v) δύναται να ενεργοποιήσει μηχανισμούς οξεοανθεκτικότητας με ταυτόχρονη εμφάνιση παραλλακτικότητας στην ικανότητα επιβίωσης σε μετέπειτα έκθεση σε έντονη όξινη καταπόνηση. Η αυξημένη παραλλακτικότητα στην οξεοανθεκτικότητα του παθογόνου, σε συνδυασμό με την παραλλακτικότητα που παρατηρήθηκε στην ενεργοποίηση της μεταγραφής του *prfA* υποδεικνύει τον κίνδυνο που υποβόσκει κατά την έκθεση του παθογόνου σε οριακές για την ανάπτυξη συνθήκες, δεδομένης της υψηλής πιθανότητας εμφάνισης ανθεκτικού υποπληθυσμού, ο οποίος μπορεί να επιβιώσει τυχόν ακόλουθης ακραίας καταπόνησης. Τα παραπάνω δεδομένα δύνανται να συνεισφέρουν στη στοχαστική περιγραφή της επιβίωσης και ανάπτυξης του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε συνθήκες πλησίον των ορίων ανάπτυξης/ μη ανάπτυξης του μικροοργανισμού καθώς και να αναδείξουν την υποβόσκουσα επικινδυνότητα στις πειραματικές προσεγγίσεις της απόκρισης του παθογόνου υπό οριακές για την ανάπτυξη συνθήκες.

Βιβλιογραφία

- Abee, T., & Wouters, J. a. (1999). Microbial stress response in minimal processing. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1-2), 65–91.
- 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.
- Angelidis, A. S., and Smith, G. M. (2003). Three transporters mediate uptake of glycine betaine and carnitine by *Listeria monocytogenes* in response to hyperosmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(2), 1013–1022.
- Aspidou, Z., & Koutsoumanis, K. P. (2015). Individual cell heterogeneity as variability source in population dynamics of microbial inactivation. *Food Microbiology*, 45(Pt B), 216–21. doi:10.1016/j.fm.2014.04.008
- Bayles, D.O., Wilkinson, B.J., 2000. Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 30 (1), 23–27.
- Begley, M., Gahan, C. G., and Hill, C. (2002). Bile stress response in *Listeria monocytogenes* LO28: Adaptation, cross-protection, and identification of genetic loci involved in bile resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 6005–6012
- Becker, L. A., M. S. Cetin, R. W. Hutkins, A. K. Benson. 1998. Identification of the gene encoding the alternative sigma factor sigmaB from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. *J. Bacteriol.* 180:4547-4554.
- Biesta-Peters, E. G., Reij, M. W., Joosten, H., Gorris, L. G. M., & Zwietering, M. H. (2010). Comparison of two optical-density-based methods and a plate count method for estimation of growth parameters of bacillus cereus. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5),
- Bigger JW. The bactericidal action of penicillin on Staphylococcus pyogenes. *Irish J. Med. Sci.* 1944a; 227:553–68.
- Bigger JW. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *Lancet.* 1944b:497–500.

- van Boekel, M. A. J. S. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *Int. J. Food Microbiol.* 74:139
- Booth, I. R. (2002). Stress and the single cell: Intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 19–30.
- Bonnet, M., and Montville, T. J. (2005). Acid-tolerant *Listeria monocytogenes* persist in a model food system fermented with nisin-producing bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 237–242.
- Brown, A. D. (1976). Microbial water stress. *Bacteriological Reviews*, 40(4), 803–846
- Brul, S., Gerwen, S. van, & Zwietering, M. (2007). Modelling microorganisms in food.
- Cabanes D., Sousa S., Cebria A., Lecuit M., Garcia-del Portillo F., Cossart P., Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein, *EMBO J.* 24 (2005) 2827-2838.
- Casey, P. G., and Condon, S. (2002). Sodium chloride decreases the bacteriocidal effect of acid pH on *Escherichia coli* O157:H45. *Int. J. Food Microbiol.* 76, 199–206.
- Cataldo, G., Conte, M. P., Chiarini, F., Seganti, L., Ammendolia, M. G., Superti, F., and Longhi, C. (2007). Acid adaptation and survival of *Listeria monocytogenes* in Italian-style soft cheeses. *J. Appl. Microbiol.* 103, 185–193
- Cerf, O., 1977. Tailing of survival curves of bacterial spores. *J. Appl. Bacteriol.* 42,1-19
- Cetin, M. S., Zhang, C., Hutkins, R. W., and Benson, A. K. (2004). Regulation of transcription of compatible solute transporters by the general stress sigma factor, σ^B , in *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 186, 3794–3802,
- Chatterjee S.S., Hossain H., Otten S., Kuenne C., Kuchmina K., Machata S., Domann E., Chakraborty T., Hain T., Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*, *Infec. Immun.* 74 (2006) 1323-1338.
- Chaturongakul, S., Raengpradub, S., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2008). Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Trends in Microbiology*, 16(8), 388–96. doi:10.1016/j.tim.2008.05.006

Chico-Calero I., Suarez .M., Gonzalez-Zorn B., Scortti M., Slaghuis J., Vazquez-Boland J.A., Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose- 6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002) 431-436

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, 163–172.

Conte, M.P, G. Petrone, A. M. Di Biase, M. G. Am- mendolia, F. Superti, L. Seganti. 2000. Acid tol- erance in *Listeria monocytogenes* influences invasiveness of enterocyte-like cells and macro- phage-like cells. Microb. Pathog. 9:137-144.

Conte, M. P., Petrone, G., Di Biase, A. M., Longhi, C., Penta, M., Tinari, A., Superti, F., Fabozzi, G., Visca, P., and Seganti, L. (2002). Effect of acid adaptation on the fate of *Listeria monocytogenes* in THP-1 human macrophages activated by gamma interferon. Infect. Immun. 70, 4369–4378

Corradini, M. G., and M. Peleg. 2003. A model of microbial survival curves in water treated with a volatile disinfectant. J. Appl. Microbiol. 95:1268– 1276.

Coroller, L., Leguerinel, I., Mettler, E., Savy, N., & Mafart, P. (2006). General model, based on two mixed weibull distributions of bacterial resistance, for describing various shapes of inactivation curves. Applied and Environmental Microbiology, 72(10), 6493–502. doi:10.1128/AEM.00876-06

Coroller, L., Kan-King-Yu, D., Leguerinel, I., Mafart, P., & Membré, J.-M. (2012). Modelling of growth, growth/no-growth interface and nonthermal inactivation areas of *Listeria* in foods. International Journal of Food Microbiology, 152(3), 139–52. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.023

Cotter, P.D., Gahan, C.G., Hill, C., (2001a). A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. Mol. Microbiol. 40 (2), 465–475.

Cotter, P. D., O’ Reilly, K., and Hill, C. (2001b). Role of the glutamate decarboxylase acid resistance system in the survival of *Listeria monocytogenes* LO28 in low pH foods. J. Food Prot. 64, 91362–91368.

Cotter, P. D., & Hill, C. (2003). Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR, 67(3), 429–453, table of contents. doi:10.1128/MMBR.67.3.429

Cotter, P. D., Ryan, S., Gahan, C. G. M., and 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(6), 2832–2839.

Csonka, L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Reviews*, 53(1), 121–147

Davis, M. J., Coote, P. J., and O’Byrne, C. P. (1996). Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: The adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. *Microbiology* 142, 2975–2982

Duche, O., Tremoulet, F., Glaser, P., Labadie, J., 2002. Salt stress proteins induced in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (4), 1491–1498.

Dussurget, O., Cabanes D., Dehoux P., Lecuit M. (2002) *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Mol. Microbiol.* 45, 1095–1106

Dykes, G. A., and Moorhead, S. M. (2000). Survival of osmotic and acid stress by *Listeria monocytogenes* strains of clinical or meat origin. *Int. J. Food Microbiol.* 56, 161–166.

Engelbrecht F., Chun S.-K., Ochs C., Hess J., Lottspeich F., Goebel W., Sokolovic Z., A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins, *Mol. Microbiol.* 21 (1996) 823-837.

Estate, B. (1997). *Listeria monocytogenes* and listeriosis (virulence), 9–29.

European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe 2008. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control, 2008.

European Food Safety Authority. The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007. *EFSA J* 2009; 223: 118–141

- Faleiro, M. L., Andrew, P. W., and Power, D. (2003). Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 207–216.
- Farber, J. M., and P. I. Peterkin. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55:476-511.
- FAO/WHO. (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Interpretative summary. Microbiological Risk Assessment Series 4. Food and Agricultural Organization of the United Nations, World Health Organization.
- FDA/FSIS. (2003). US Quantitative assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Chapter IV: Hazard characterization. Food and Drug Administration, US Food Safety and Inspection Services.
- Feehily, C., & Karatzas, K. A. G. (2012). Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05434.x
- Ferreira, A., C. P. O'Byrne, and K. J. Boor. 2001. Role of σ^B in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4454–4457
- Ferreira, A., Sue, D., O'Byrne, C.P., Boor, K.J., 2003. Role of *Listeria monocytogenes* sigmaB in survival of lethal acidic conditions and in the acquired acid tolerance response. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (5), 2692–2698.
- Flahaut, S., Hartke, A., Giard, J. C., Benachour, A., Boutibonnes, P., and Auffray, Y. (1996). Relationship between stress response toward bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 138, 49–54.
- Francois, K., Devlieghere, F., Standaert, a. R., Geeraerd, a. H., Van Impe, J. F., & Debevere, J. (2006). Effect of environmental parameters (temperature, pH and aw) on the individual cell lag phase and generation time of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 326–335.
- 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(11), 4696–4704

- Fraser, K. R., and O' Byrne, C. P. (2002). Osmoprotection by carnitine in a *Listeria monocytogenes* mutant lacking the OpuC transporter: Evidence for a low affinity carnitine uptake system. *FEMS Microbiol. Lett.* 211, 189–194.
- Fraser, K. R., Sue, D., Wiedmann, M., Boor, K. J., and O' Byrne, C. P. (2003). Role of σ^B in regulating the compatible solute uptake systems of *Listeria monocytogenes*: Osmotic induction of opuC is sigmaB dependent. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(4), 2015–2022
- Gahan, C. G., O'Driscoll, B., and Hill, C. (1996). Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3128–3132.
- Galinski, E. A. (1995). Osmoadaptation in bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 37, 273–328
- Gandhi, M., & Chikindas, M. L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113(1), 1–15.
- Gardan, R., Duche, O., Leroy-Setrin, S., Labadie, J., 2003. Role of ctc from *Listeria monocytogenes* in osmotolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (1), 154–161.
- Garner, M. R., James, K. E., Callahan, M. C., Wiedmann, M., & 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5384–5395. doi:10.1128/AEM.00764-06
- Goebel, W., Gonza, B., Domi, G., & Patoge, G. De. (2001). *Listeria Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants*, 14(3), 584–640. doi:10.1128/CMR.14.3.584
- Goebel W., Kreft J., Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*, *Microb. Infect.* 3 (2001) 571-584.
- Guillier, L., & Augustin, J. (2006). Modelling the individual cell lag time distributions of *Listeria monocytogenes* as a function of the physiological state and the growth conditions, 111, 241–251.
- Hajmeer, M., I. Basheer, C. Hew, and D. O. Cliver. 2006. Modeling the survival of *Salmonella* spp. in chorizos. *Int. J. Food Microbiol.* 107:59–67

- Higuchi, T., Hayashi, H., and Abe, K. (1997). Exchange of glutamate and gamma-aminobutyrate in a *Lactobacillus* strain. *J. Bacteriol.* 179, 3362–3364
- Hill, C., Cotter, P. D., Sleator, R. D., & Gahan, C. G. M. (2002). Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing, 12, 273–283.
- Johnston, R., & Desplan, C. (2010). Stochastic Mechanisms of Cell Fate Specification that Yield Random or Robust Outcomes. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, (26), 689–719. doi:10.1146/annurev-cellbio-100109-104113.Stochastic
- Joseph B., Przybilla K., Schauer C., Slaghuis J., Fuchs T.M., Goebel W., Identification of *Listeria monocytogenes* genes contributing to intracellular replication by expression profiling and mutant screening, *J. Bacteriol.* 188 (2006) 556-568
- Karatzas, K. A. G., Suur, L., & O’Byrne, C. P. (2012). Characterization of the intracellular glutamate decarboxylase system: Analysis of its function, transcription, and role in the acid resistance of various strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(10), 3571–3579.
- Kazmierczak, M. J., Mithoe, S. C., Boor, K. J. & Wiedmann, M.(2003). *Listeria monocytogenes* σ^B regulates stress response and virulence functions. *J. Bacteriol.* 185 (19), 5722–5734.
- Kearns, D.B. and R. Losick, Cell population heterogeneity during growth of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev*, 2005. 19(24): p. 3083-94.
- Ko, R., and Smith, L. T. (1999). Identification of an ATP-driven, osmoregulated glycine betaine transport system in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(9), 4040–4048.
- Koutsoumanis, K. P. (2008). A study on the variability in the growth limits of individual cells and its effect on the behavior of microbial populations. *International Journal of Food Microbiology*, 128(1), 116–121.
- Koutsoumanis, K. P., & Lianou, A. (2013). Stochasticity in colonial growth dynamics of individual bacterial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(7), 2294–2301.
- Lecuit, M. (2007). Human listeriosis and animal models. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 9(10), 1216–25.

Leyer, G. J., and Johnson, E. A. (1992). Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2075–2080.

Lingnau A., Domann E., Hudel M., Bock M., Nichterlein T., Wehland J., Chakraborty T., Expression of *Listeria monocytogenes* EGD inlA and inlB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms, *Infect. Immun.* 64 (1995) 1002-1006

Lou, Y., and Yousef, A. E. (1997). Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1252–1255.

Ma, J., Ibekwe, a M., Yi, X., Wang, H., Yamazaki, A., Crowley, D. E., & Yang, C.-H. (2011). Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 and its mutants in soils. *PloS One*, 6(8), e23191. doi:10.1371/journal.pone.0023191

Makariti, I. P., Printezi, A., Kapetanakou, A. E., Zeaki, N., & Skandamis, P. N. (2015). Investigating boundaries of survival , growth and expression of genes associated with stress and virulence of *Listeria monocytogenes* in response to acid and osmotic stress. *Food Microbiology*.

Manios, S. G., Konstantinidis, N., Gounadaki, A. S., & Skandamis, P. N. (2013). Dynamics of low (1-4 cells) vs high populations of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium in fresh-cut salads and their sterile liquid or solidified extracts. *Food Control*, 29(2),

Marr A.K., Joseph B., Mertins S., Ecke R., Muller-Altrock S., Goebel W. Overexpression of PrfA leads to growth inhibition of *Listeria monocytogenes* in glucose-containing culture media by interfering with glucose uptake, *J. Bacteriol.* 188 (2006) 3887-3901.

Marianne and Bier (2003) *International Handbook of Foodborne Pathogens*

Melo, J., Andrew, P. W., & Faleiro, M. L. (2015). *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses.

Mellefont, L. a., McMeekin, T. a., & Ross, T. (2004a). The effect of abrupt osmotic shifts on the lag phase duration of physiologically distinct populations of *Salmonella* typhimurium. *International Journal of Food Microbiology*, 92, 111–120.

- Mellefont, L. a., McMeekin, T. a., & Ross, T. (2004b). The effect of abrupt osmotic shifts on the lag phase duration of physiologically distinct populations of *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*, 92, 111–120.
- Mengaud J., Dramsi S., Gouin E., Vazquez-Boland J.A., Milon G., Cossart P., Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene which is autoregulated, *Mol. Microbiol.* 5 (1991) 2273-2283.
- McGann, P., Wiedmann, M., and Boor, K. J. (2007). The alternative sigma factor σ^B and the virulence gene regulator PrfA both regulate transcription of *Listeria monocytogenes* internalins. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2919–2930.
- McKellar, R. C., Lu, X., & Knight, K. P. (2002). Proposal of a novel parameter to describe the influence of pH on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 127–135.
- McKellar, R. C., & Lu, X. (2003). Modeling microbial responses in foods. In *Modeling microbial responses in foods* (Vol. 28, p. i)
- McLauchlin, J. (1993) Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. *Environmental Policy and Practice* 3, 201-214
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V., 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5 (5), 607–625
- Michel E., Mengaud J., Galsworthy S., Cossart P., Characterization of a large motility gene cluster containing cheR, motAB genes of *Listeria monocytogenes* and evidence that PrfA downregulates motility genes, *FEMS Microbiol. Lett.* 169 (1998) 341-347.
- Milohanic, E., P. Glaser, J. Y. Coppee, L. Frangeul, Y. Vega, J. A. Vazquez- Boland, F. Kunst, P. Cossart, and C. Buchrieser. 2003. Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Mol. Microbiol.* 47:1613–1625.
- Mytilinaios, I., Salih, M., Schofield, H. K., & Lambert, R. J. W. (2012). Growth curve prediction from optical density data. *International Journal of Food Microbiology*, 154, 169–176.
- Mordechai, S. (2011). Applications of Monte Carlo Method in Science and Engineering. In *Applications of Monte Carlo Method in Science and Engineering*.

- Murray, E.G.D., Webb, R.A., Swann, M.B.R., 1926. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *J. Pathol. Bacteriol.* 29, 407–439.
- Nadon, C. A., B. M. Bowen, M. Wiedmann, and K. J. Boor. 2002. Sigma B contributes to PrfA-mediated virulence in *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 70:3948–3952
- Nicolaï, B.M., Van Impe, J.F., 1996. Predictive food microbiology: a probabilistic approach. *Mathematics and Computers in Simulation* 42, 287–292
- O’Byrne, C. P., & Karatzas, K. a G. (2008). Chapter 5 The Role of Sigma B (σ^B) in the Stress Adaptations of *Listeria monocytogenes*: Overlaps Between Stress Adaptation and Virulence. *Advances in Applied Microbiology*, 65(08), 115–140. doi:10.1016/S0065-2164(08)00605-9
- O’Driscoll, B., Gahan, C.G., Hill, C., 1996. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (5), 1693–1698.
- O’Driscoll, B., C. G. M. Gahan, and C. Hill. 1997. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis analysis of the acid tolerance response in *Listeria monocytogenes* LO28. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2679–2685
- Olesen, I., F. K. Vogensen, L. Jespersen. 2009. Gene transcription and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains after exposure to acidic and NaCl stress. *Foodborne Pathog. Dis.* 6:669-680.
- Olier, M., Rousseaux, S., Piveteau, P., Lemaitre, J. P., Rousset, A., and Guzzo, J. (2004). Screening of glutamate decarboxylase activity and bile salt resistance of human asymptomatic carriage, clinical, food, and environmental isolates of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 93, 87–99.
- Peleg, M., and M. B. Cole. 1998. Reinterpretation of microbial survival curves. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38:353
- Raj, A., & Oudenaarden, A. van. (2012). Stochastic gene expression and its consequences. *Changes*, 29(2), 997–1003.
- Raser, J. M., & O’Shea, E. K. (2004). Control of stochasticity in eukaryotic gene expression. *Science (New York, N.Y.)*, 304(2004), 1811–1814.

Raynaud C., Charbit A., Regulation of expression of type I signal peptidases in *Listeria monocytogenes*, *Microbiology* 151 (2005) 3759-3776.

Reading, F. (1998). *Listeria monocytogenes*, (1982), 1650–1655.

Ripio M.T., Dominquez-Bernal G., Lara M., Suarez M., Vazquez-Boland J.-A., A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in *Listeria monocytogenes*, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 1533-1540.

Ripio M.-T., Vazquez-Boland J.-A., Vega Y., Nair S., Berche P., Evidence for expressional crosstalk between the central virulence regulator PrfA and the stress response mediator ClpC in *Listeria monocytogenes*, *FEMS Microbiol. Lett.* 158 (1998) 45-50.

Robinson, T. P., Ocio, M. J., Kaloti, A., & MacKey, B. M. (1998). The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 83–92.

Rocourt, J., Cossart, P., 1997. *Listeria monocytogenes*. In: Doyle, M.P., Buechat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology — Fundamentals and Frontiers*. American Society for Microbiology (ASM) press, Washington DC, pp. 337–352.

Rocourt, J., Bille, J., 1997. Foodborne listeriosis. *World Health Stat. Q.* 50 (1–2), 67–73.

Rouquette C., Ripio M.T., Pellegrini E., Bolla J.M, Tascon R.I , Vazquez-Boland J.-A., Berche P., Identification of a ClpC ATPase required for stress tolerance and in vivo survival of *Listeria monocytogenes*, *Mol. Microbiol.* 21 (1996) 977-987

Ryan, S., Hill, C., & Gahan, C. G. M. (2008). Acid Stress Responses in *Listeria monocytogenes*. *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 65, pp. 67–91). Elsevier Masson SAS.

Ryan, S., M. Begley, C. G. Gahan, C. Hill. 2009. Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: regulation and role in acid tolerance. *App. Environ. Microbiol.* 11:432-445.

Samelis, J., Ikeda, J. S., and Sofos, J. N. (2003). Evaluation of the pH-dependent, stationary-phase acid tolerance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella*

*Typhimurium*DT104 induced by culturing in media with 1% glucose: A comparative study with *Escherichia coli* O157: H7. *J. Appl. Microbiol.* 95, 563–575

Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerging infectious diseases.* 2011;17(1):7-15.

Scotti, M., Monzó, H. J., Lacharme-Lora, L., Lewis, D. a, & Vázquez-Boland, J. a. (2007). The PrfA virulence regulon. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 9(10), 1196–207. doi:10.1016/j.micinf.2007.05.007

van Schaik, W., Gahan, C. G., and Hill, C. (1999). Acid-adapted *Listeria monocytogenes* displays enhanced tolerance against the lantibiotics nisin and lactacin 3147. *J. Food. Prot.* 62, 536–539.

Schwab,U. et al. (2005) The *Listeria monocytogenes* *prfAP2* promoter is regulated by sB in a growth phase dependent manner. *FEMS Microbiol. Lett.* 245, 329–336

Singh, R., Kim, J., Shepherd, M. W., Luo, F., & Jiang, X. (2011). Determining thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh compost by simulating early phases of the composting process. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(12), 4126–35. doi:10.1128/AEM.02873-10

Skandamis, P. N., Yoon, Y., Stopforth, J. D., Kendall, P. A., and Sofos, J. N. (2008). Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiol.* 25, 294–303.

Sleator, R. D., Gahan, C. G. M., Abee, T., and Hill, C. (1999). Identification and disruption of BetL, a secondary glycine betaine transport system linked to the salt tolerance of *Listeria monocytogenes* LO28. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2078–2083

Sleator, R. D., Wouters, J., Gahan, C. G. M., Abee, T., and Hill, C. (2001). Analysis of the role of OpuC, an osmolyte transport system, in salt tolerance and virulence potential of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2692–2698.

Sleator, R. D., Wood, J. M., and Hill, C. (2003). Transcriptional regulation and post-translational activity of the betaine transporter BetL in *Listeria monocytogenes* are controlled by environmental salinity. *J. Bacteriol.* 185(24), 7140–7144.

- Sleator R.D., Wemekamp-Kamphuis H.H., Gahan C.G.M., Abee T., Hill C., A PrfA-regulated bile exclusion (BilE) is a novel virulence factor in *Listeria monocytogenes*, Mol. Microbiol. 55 (2005) 1183-1195
- Sleator, R. D., and Hill, C. (2005). A novel role for the LisRK two-component regulatory system in listerial osmotolerance. Clin. Microbiol. Infect. 11, 599–601
- Small, P.L.C., Waterman, S.R., 1998. Acid stress, anaerobiosis and gadCB lessons from *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli*. Trends Microbiol. 6 (6), 214–216.
- Smelt, J. P. P. M., Otten, G. D., & Bos, A. P. (2002). Modelling the effect of sublethal injury on the distribution of the lag times of individual cells of *Lactobacillus plantarum*. International Journal of Food Microbiology, 73, 207–212.
- Smith, D. K., Kassam, T., Singh, B., and Eliot, J.F.(1992) *Escherichia coli* has two homologous glutamate decarboxylase genes that map to distinct loci. J. Bacteriol 174: 5820-5826.
- Soni, K. A., Nannapaneni, R., & Tasara, T. (2011). REVIEW An Overview of Stress Response Proteomes in *Listeria monocytogenes*, 1(1), 66–85.
- Stopforth, J. D., Skandamis, P. N., Geornaras, I., and Sofos, J. N. (2007). Acid tolerance of acid- adapted and nonacid-adapted *Escherichia coli* O157:H7 strains in beef decontamination runoff fluids or on beef tissue. Food Microbiol. 24, 530–538
- Sue, D., D. Fink, M. Wiedmann, K. J. Boor. 2004. Sig- maB-dependent gene induction and expression in *Listeria monocytogenes* during osmotic and acid stress conditions simulating the intestinal environment. Microbiology 150:3843-3855
- Soni, K. A., Nannapaneni, R., & Tasara, T. (2011). REVIEW An Overview of Stress Response Proteomes in *Listeria monocytogenes*, 1(1), 66–85.
- Swaminathan, B., & Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. Microbes and Infection / Institut Pasteur, 9(10), 1236–43. doi:10.1016/j.micinf.2007.05.011
- Taiz, L. (1984). Plant cell expansion: Regulation of cell wall mechanical properties. Annual Review of Plant Physiology, 35, 585–657.

Van Boekel, M. (2002). On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1-2), 139–159. Veening JW, Smits WK, Kuipers OP. Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 2008; 62:193–210.

Virto, R., D. Sanz, I. Alvarez, Condon, and J. Raso. 2005. Inactivation kinetics of *Yersinia enterocolitica* by citric and lactic acid at different temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* 103:251

Waterman, S.R., and Small, P.L.C. (1996) Identification of σ^B -dependent genes associated with the stationary phase acid resistance phenotype of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 21:925-940.

Werbrouck, H., A. Vermeulen, E. Van Coillie, W. Messens, L. Herman, F. Devlieghere, M. Uyttendaele. 2009. Influence of acid stress on survival, expression of virulence genes and invasion capacity into Caco-2 cells of *Listeria monocytogenes* strains of different origins. *Int. J. Food Microbiol.* 134:140-146.

Wiedmann, M., Arvik, T.J., Hurley, R.J., Boor, K.J., 1998. General stress transcription factor sigmaB and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 180 (14), 3650–3656.

Withell, E.R., 1942. The significance of variation in the shape of the time-survivor curves. *J. Hyg.* 42, 124–132

Wemekamp-Kamphuis, H.H., Wouters J.A., Leeuw P.,L.,A.,, Hain T., Chakraborty T., Abee T., et al. (2004) Identification of sigma factor σ^B -controlled genes and their impact on acid stress, high hydrostatic pressure, and freeze survival in *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3457–3466