

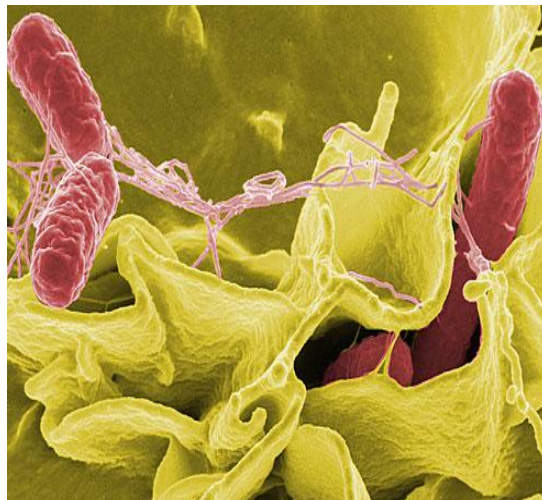
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

Π.Μ.Σ. «ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

**«Μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν την προσκόλληση και την μετέπειτα εσωτερικοποίηση τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών σε φυλλώδη λαχανικά καθώς και μελέτη της φυσιολογίας τους»**



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΑΠΟΣΤΟΛΙΔΟΥ ΖΩΗ

ΑΘΗΝΑ 2015

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ  
ΠΟΤΩΝ**

**ΑΠΟΣΤΟΛΙΔΟΥ ΖΩΗ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Π.Μ.Σ.)**

**«ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**«Μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν την προσκόλληση και την μετέπειτα εσωτερικοποίηση τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών σε φυλλώδη λαχανικά καθώς και μελέτη της φυσιολογίας τους»**

Επιβλέπων καθηγητής: Σκανδάμης Παναγιώτης (Επίκουρος Καθηγητής)

Εξεταστική – Συμβουλευτική Επιτροπή:

Σκανδάμης Παναγιώτης (Επίκουρος Καθηγητής)

Πανάγου Ευστάθιος (Επίκουρος Καθηγητής)

Ματαράγκας Μάριος (Επίκουρος Καθηγητής)

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	6
Abstract.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 Η σημασία των λαχανικών, η αύξηση της κατανάλωσης τους και ο κίνδυνος τροφιογενών λοιμώξεων.....	11
1.1.1 Καταγεγραμμένα κρούσματα <i>Salmonella</i> spp. σε λαχανικά.....	13
1.1.2 Νομοθεσία και Ευρωπαϊκός Κανονισμός.....	17
1.2. Ο παθογόνος μικροοργανισμός <i>Salmonella</i> spp.....	17
1.2.1 Ιστορικά στοιχεία για την ανακάλυψη της <i>Salmonella</i> spp.....	17
1.2.2 Μελέτη του γένους <i>Salmonella</i> .....	18
1.2.3 Ο μικροοργανισμός και τα χαρακτηριστικά του.....	20
1.2.4 Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά.....	23
1.3 Πηγές μόλυνσης των λαχανικών και ικανότητα εσωτερικοποίησης του παθογόνου.....	26
1.3.1 “Διαδρομές” της μικροβιακής εσωτερικοποίησης.....	32
1.3.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή εσωτερικοποίηση.....	36
1.4 Εκκριντικά συστήματα που αφορούν την εσωτερικοποίηση του παθογόνου και ενεργοποίηση της άμυνας των φυτών.....	41

1.5 Αυξημένη επικινδυνότητα της εσωτερικοποίησης λόγω αναποτελεσματικότητας των απολυμαντικών και νέοι τρόποι αντιμετώπισης της.....	43
1.6 Καταπόνηση του παθογόνου μικροοργανισμού (stress).....	45
1.6.1 Όξινη καταπόνηση και επιβίωση του μικροοργανισμού <i>Salmonella</i> spp. σε αυτές τις συνθήκες.....	45
1.7 Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	49
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	
2.1 Αναλώσιμα υλικά.....	51
2.1.1 Χημικά αντιδραστήρια.....	51
2.1.2 Θρεπτικά υποστρώματα.....	51
2.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	52
2.3 Μικροβιακά στελέχη.....	52
2.4 Φυλλώδη Λαχανικά.....	53
2.5 Πειραματική διαδικασία.....	54
2.5.1 Ανανέωση των μικροοργανισμών.....	54
2.5.2 Πειράματα εκτίμησης ολικών, προσκολλημένων και εσωτερικοποιημένων κυττάρων του παθογόνου μικροοργανισμού στα λαχανικά.....	55
2.5.2.1 Εμβολιασμός λαχανικών.....	56

2.5.2.2 Δειγματοληψία.....	57
2.5.2.2.α Μέθοδος επιχρίσματος (swabbing).....	58
2.5.2.2.β Μέθοδος εξυγίανσης επιφάνειας.....	59
2.5.2.2.γ Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων.....	59
2.5.2.2.δ Τεχνική επιφανειακής επίστρωσης (spread plate technique).....	60
2.5.3 Μέθοδος απαρίθμησης βακτηριακών αποικιών.....	60
2.5.4 Έκθεση σε όξινη καταπόνηση.....	61
2.5.4.1 Μελέτη ανοχής ολικών, προσκολλημένων και εσωτερικοποιημένων κυττάρων <i>Salmonella</i> σε χαμηλό pH.....	61
2.5.4.2 Ανάκτηση τραυματισμένων κυττάρων-Τεχνική διπλής στρώσης.....	62
2.5.5 Μέτρηση pH.....	63
2.6 Μελέτη στελεχών <i>Salmonella</i> ως προς το βαθμό προσκόλλησης και εσωτερικοποίησης στην επιφάνεια φυτικού ιστού.....	63
2.7 Εκτίμηση της Ολικής Μεσόφιλης Μικροχλωρίδας (OMX) των λαχανικών.....	64
2.8 Πειράματα μελέτης φυτικών εκχυλισμάτων.....	65
2.8.1 Μελέτη της μείωσης του παθογόνου μικροοργανισμού <i>Salmonella</i> spp. σε εκχυλίσματα φυλλωδών λαχανικών μετά από έκθεση σε όξινη καταπόνηση.....	65
2.8.2 Επίδραση της παρουσίας διαφορετικών φυτικών εκχυλισμάτων κατά τη διάρκεια έκθεσης του μικροοργανισμού <i>Salmonella</i> σε συνθήκες όξινης καταπόνησης.....	67
2.9 Επίδραση της εποίκισης διαφορετικών λαχανικών στη μεταβολή των επιπέδων γονιδιακής μεταγραφής του <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	69

2.9.1 Απομόνωση ολικού RNA.....	71
2.9.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time PCR).....	73
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
3.1 Εκτίμηση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας των λαχανικών.....	76
3.2 Βαθμός προσκόλλησης και εσωτερικοποίησης του <i>S. Enteritidis</i> σε φυλλώδη λαχανικά.....	79
3.3 Ικανότητα προσκόλλησης και εσωτερικοποίησης διαφορετικών στελεχών <i>Salmonella</i> σε φυλλώδη λαχανικά .....	82
3.4 Έκθεση του <i>S. Enteritidis</i> σε συνθήκες όξινης καταπόνησης.....	84
3.4.1 Απόκριση των ολικών, προσκολλημένων και εσωτερικοποιημένων σε λαχανικά κυττάρων του <i>Salmonella</i> Enteritidis έναντι όξινης καταπόνησης.....	85
3.5 Πειράματα μελέτης φυτικών εκχυλισμάτων.....	98
3.5.1 Μελέτη της κινητικής του παθογόνου μικροοργανισμού <i>Salmonella</i> spp. σε εκχυλίσματα φυλλωδών λαχανικών μετά από έκθεση σε όξινη καταπόνηση.....	98
3.5.2 Επίδραση της παρουσίας διαφορετικών φυτικών εκχυλισμάτων κατά τη διάρκεια έκθεσης του μικροοργανισμού <i>Salmonella</i> σε συνθήκες όξινης καταπόνησης .....	105
3.6 Επίδραση της εποίκισης διαφορετικών λαχανικών στη μεταβολή των επιπέδων γονιδιακής μεταγραφής του <i>Salmonella</i> Enteritidis .....	108
4.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	113
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	114

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Salmonella* spp. δύναται να εποικίσει φυλλώδη λαχανικά είτε επιφανειακά (προσκόλληση) είτε διεισδύοντας στο εσωτερικό τους (εσωτερικοποίηση), μέσω φυσικών ανοιγμάτων (π.χ. στομάτια) ή τραυματισμών (π.χ. λόγω τομής) του ιστού. Παρά την αυξημένη επικινδυνότητα των λαχανικών εξαιτίας της ανεπάρκειας των συμβατικών μεθόδων απολύμανσης ενάντια στα εσωτερικοποιημένα κύτταρα, πληροφορίες σχετικά με τη φυσιολογία των τελευταίων και τους πιθανούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας είναι περιορισμένες.

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η εκτίμηση α) της ικανότητας προσκόλλησης και εσωτερικοποίησης του *Salmonella enterica* σε φυλλώδη λαχανικά, β) της οξεοανθεκτικότητας των προσκολλημένων και εσωτερικοποιημένων κυττάρων, γ) των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τη λοιμοξιογόνο δράση και το εκκριτικό σύστημα T3SS (*hilA*, *prgH*, *invA*, *avrA*, *ssrB*) και τους μηχανισμούς απόκρισης έναντι καταπονήσεων (*cadB*, *proV*) στις ανωτέρω κατηγορίες κυττάρων και δ) των παραγόντων όπως η σύσταση του λαχανικού, η παρουσία ενδογενούς χλωρίδας και η μικροδομή του τροφίμου (υποστρώματος) στην μετέπειτα απόκριση του μικροοργανισμού έναντι όξινης καταπόνησης.

Σπανάκι, μαρούλι, βλίτα, ιταλικά χόρτα και ρόκα εμβολιάστηκαν με *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium και Infantis, ξεχωριστά, με τη μέθοδο της εμβάπτισης (7 log CFU/mL) και συντηρήθηκαν για 2h και 48h στους 5°C και 20°C (n=6). Εν συνεχεία, εκτιμήθηκε ο ανακτώμενος ολικός, προσκολλημένος (μέθοδος επιχρίσματος) και εσωτερικοποιημένος (ύστερα από εξυγίανση της φυλλικής επιφάνειας με 1% w/v AgNO<sub>3</sub>) πληθυσμός του *Salmonella* καθώς και η επιβίωση του εκάστοτε υποπληθυσμού έναντι ακραίας όξινης καταπόνησης pH 2.7 (HCl). Η μεταβολή των επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε με RT-qPCR (n=3), ενώ το *16SrRNA* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς. Επιπλέον, προκειμένου να μελετηθεί το πώς επιδρά η σύσταση των μελετούμενων λαχανικών στην επιβίωση του παθογόνου, εκχυλίσματα από το εκάστοτε λαχανικό εκτέθηκαν σε συνθήκες όξινης καταπόνησης pH 2.7 (HCl), επίσης.

Ο προσκολλημένος και εσωτερικοποιημένος πληθυσμός του *Salmonella spp.* μετά από 2 h συντήρησης ανερχόταν περίπου στους 3.6-4.8 και 3.2-5.0 log CFU/g, αντίστοιχα, με τη μεγαλύτερη εσωτερικοποίηση να παρατηρείται στο σπανάκι και στα ιταλικά χόρτα ( $P<0.05$ ). Παραμονή των εμβολιασμένων λαχανικών για 48 h στους 20°C είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των ανακτώμενων προσκολλημένων και εσωτερικοποιημένων πληθυσμών κατά 1-2 log CFU/g, εξαιτίας είτε της ανάπτυξης του εκάστοτε υποπληθυσμού, είτε της αύξησης της προσκόλλησης και εσωτερικοποίησης, γεγονός που συμφωνεί με την παρατηρηθείσα επαγωγή της έκφρασης (10-100 φορές) γονιδίων του T3SS. Διαφορές στους εσωτερικοποιημένους πληθυσμούς (0.5-1.0 log CFU/g) ( $P<0.05$ ) διαφορετικών οροτύπων παρατηρήθηκαν κυρίως κατά τη συντήρηση στους 5°C. Αυξημένη οξεοανθεκτικότητα παρουσίασαν τα προσκολλημένα κύτταρα έναντι των εσωτερικοποιημένων, ενώ παραμονή του *Salmonella* σε χαμηλή θερμοκρασία ευαισθητοποίησε τον παθογόνο έναντι ακραίας όξινης καταπόνησης. Τέλος, αυξημένη οξεοανθεκτικότητα παρουσίασαν τα εσωτερικοποιημένα κύτταρα σε μαρούλι και βλίτα, που είχαν συντηρηθεί στους 20°C, δεδομένου του επιβιώσαντα πληθυσμού (1.0 log CFU/g) ύστερα από 60 min σε pH 2.7. Σε ότι αφορά τα εκχυλίσματα των λαχανικών, η παρουσία ή η απουσία της ενδογενούς μικροχλωρίδας δεν είχε σημαντικό ρόλο στην οξεοανθεκτικότητα του παθογόνου αλλά τα θρεπτικά συστατικά από τα οποία απαρτιζόταν το καθένα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα συμβάλλουν στην πληρέστερη κατανόηση της φυσιολογίας του παθογόνου *Salmonella spp.* κατά την εποίκισή του σε φυλλώδη λαχανικά και μπορούν να αξιοποιηθούν στην καλύτερη εκτίμηση της επικινδυνότητας στον τομέα των λαχανικών.

**Λέξεις κλειδιά:** *Salmonella*, εσωτερικοποίηση, οξεοανθεκτικότητα, λαχανικά, εκχυλίσματα λαχανικών



## ABSTRACT

*Salmonella* colonizes or penetrates leafy greens. The ability of internalized bacteria to evade common disinfection practices, poses a well-established risk. Nevertheless, little is known about the physiology of internalized cells and the underpinning stress resistance mechanisms.

The aims of the study were: i) to assess the attachment and internalization of different *Salmonella enterica* serotypes regarding different leafy vegetables, ii) to evaluate the acid tolerance of internalized and attached cells, iii) to monitor the transcriptional changes regarding stress (*cadB*, *proV*) and virulence/ secretion system-T3SS associated genes (*hila*, *prgH*, *invA*, *avrA*, *ssrB*), associated with the aforementioned two cell types and iv) to evaluate how affect the compounds of vegetables and the presence of native microflora to response of microorganism under acid tolerance.

Spinach, lettuce, green amaranth, arugula and endive were inoculated by immersion (7 log CFU/mL), individually, with *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium* and *S. Infantis* and stored at 5°C and 20°C for 2h and 48h (n=6). Population of total, attached (swab method) and internalized (after surface decontamination with 1% w/v AgNO<sub>3</sub>) *Salmonella*, as well as their survival against pH 2.7 (HCl) were assessed. Transcriptional changes were determined using quantitative Real Time-PCR (n=3), while *16SrRNA* served as a reference gene. Also, survival of *Salmonella* was assessed against pH 2.7 (HCl) on extracts of vegetables.

Spinach and endive allowed the highest ( $P<0.05$ ) internalization of the target organism, while attached and internalized *Salmonella*, 2 h after inoculation, reached 3.6-4.8 and 3.2-5.0 log CFU/g. Storage of vegetables for 48h at 20°C increased the recovery of attached and internalized *Salmonella* by 1-2 log CFU/g, though it is unknown whether this derives from growth and/or spreading by swarming, swimming, or additional colonization. However, habituation of *Salmonella* at 20°C induced the transcription (10-100 folds) of T3SS-related genes. Inter-serovar variation regarding the internalization ability was evident (0.5-1.0 log CFU/g) only at refrigeration temperature. Regarding acid tolerance response, attached cells exhibited higher survival rates against low pH than the

internalized ones. Acid sensitization of *Salmonella* was a result of habituation at 5°C, while habituation at 20°C on lettuce and amaranth induced acid tolerance of internalized cells, manifested by 1.0 log CFU/g survival after 60 min at pH 2.7. As regards, the extracts of vegetables, the compounds of each vegetable affects on survival of microorganism and not native microflora.

Our findings reveal physiology aspects of *Salmonella* colonizing leafy vegetables and therefore could be supportive material in quantitative risk assessment of pathogens in fresh produce sector.

**Keywords:** *Salmonella*, internalization, acid tolerance, vegetables, extracts of vegetable

## Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Θα ήθελα να απευθύνω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα αυτής της μεταπτυχιακής ερευνητικής μελέτης και Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου κ. Σκανδάμη Παναγιώτη, όχι μόνο για την ανάθεση του θέματος και για την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπό μου, όσον αφορά στη σωστή διεκπεραίωση της μεταπτυχιακής μελέτης είτε σε επίπεδο διεξαγωγής των πειραμάτων είτε σε επίπεδο συγγραφής της, αλλά και για την πολύτιμη βοήθεια, καθοδήγηση και εν γένει συμβολή του καθ' όλη τη διάρκεια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών. Δε θα μπορούσα να παραλείψω την έκφραση των θερμότερων ευχαριστιών μου στον υποψήφιο διδάκτωρα Γριβοκωστόπουλο Νικόλαο για τη βοήθεια και την ανεκτίμητη συνεισφορά του στην εκπόνηση αυτής της μελέτης, για την προθυμία του και την καθοδήγηση του τόσο κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων όσο και για τη συγγραφή της. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω και στην υποψήφια διδάκτωρα Μακαρίτη Ιφιγένεια για τη βοήθεια της στη διεξαγωγή των μοριακών πειραμάτων καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές της καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης μου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία μας και τη δημιουργία ενός ευχάριστου περιβάλλοντος στον εργαστηριακό χώρο αλλά και όλους όσους έμμεσα ή άμεσα συνεισέφεραν στην ολοκλήρωση αυτής της μεταπτυχιακής μελέτης. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες τόσο στους γονείς μου όσο και στους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράσταση και στήριξή τους μέχρι την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής αυτής μελέτης.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

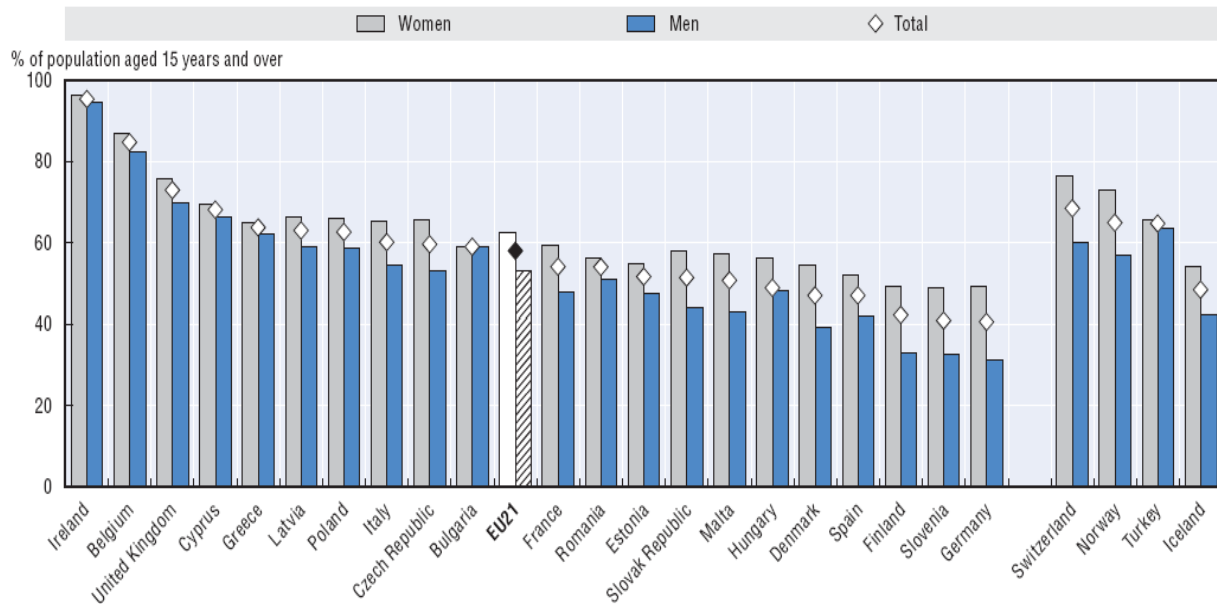
### 1.1.Η σημασία των λαχανικών, η αύξηση της κατανάλωσης τους και ο κίνδυνος τροφιμογενών λοιμώξεων

Τα τελευταία χρόνια, η τάση των ανθρώπων να στραφούν σε έναν πιο υγιεινό τρόπο ζωής, οδήγησε στην ολοένα και μεγαλύτερη κατανάλωση φρέσκων και ελάχιστα επεξεργασμένων φρούτων και λαχανικών, τα οποία λόγω των θρεπτικών συστατικών που περιέχουν είναι σημαντικά για την υγεία του ανθρώπου (Abadias *et al.*, 2008; Falomir *et al.*, 2010). Άλλωστε δεν είναι λίγοι και οι οργανισμοί υγείας που επισημαίνουν ότι η κατανάλωση τους μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του ποσοστού εκδήλωσης ορισμένων ασθενειών όπως οι καρδιοαγγειακές παθήσεις και ο καρκίνος (Brownson *et al.*, 1996; Berger *et al.*, 2010).

Τα λαχανικά χαρακτηρίζονται από τη μεγάλη περιεκτικότητα τους σε νερό, τη μικρή περιεκτικότητα τους σε λίπος, τη σχετικά μικρή περιεκτικότητα τους σε υδατάνθρακες και πρωτεΐνες και τη σημαντική περιεκτικότητα τους σε άλατα και βιταμίνες. Όλα τα λαχανικά και ιδιαίτερα τα πράσινα αποτελούν καλές πηγές για τη πρόσληψη σημαντικών αλάτων που είναι απαραίτητα για την εξουδετέρωση των οξέων που παράγονται κατά τη διάρκεια της πέψης του κρέατος, του τυριού και άλλων τροφίμων, συμβάλλοντας στην επίτευξη και διατήρηση της σωστής αντίδρασης του αίματος και των άλλων σωματικών υγρών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα, αποτελούν το σπανάκι που είναι πλούσιο σε ασβέστιο, σίδηρο και φώσφορο, το μαρούλι που είναι πλούσιο σε ασβέστιο και σίδηρο κ.ά. Σε ότι αφορά τις βιταμίνες που περιέχουν είναι αναγκαίες για την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και για τη διατήρηση της καλής υγείας του ανθρώπου και αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής του. Επιπλέον, τα πιο πολλά λαχανικά και ιδιαίτερα τα φυλλώδη όπως το λάχανο, το σπανάκι, το μαρούλι κ.λ.π χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε νερό και κυτταρίνη και με τον σχετικά μεγάλο όγκο που έχουν βοηθούν στην πέψη άλλων συμπυκνωμένων τροφών, εξασφαλίζοντας με αυτό τον τρόπο την καλύτερη λειτουργία του πεπτικού συστήματος.

Στατιστικά στοιχεία που αναφέρονται στις Η.Π.Α, δείχνουν ότι η κατά κεφαλήν κατανάλωση των φρούτων και των φρέσκων λαχανικών αυξήθηκε σημαντικά από το 1982 έως το 1997, κατά 18% και 29% αντίστοιχα (Garrett *et al.*, 2003) και συνεχίζει να αυξάνεται με εκθετικό ρυθμό και ως σήμερα (Εικόνα 1.1). Άλλωστε, ο κλάδος της

γεωργικής παραγωγής έχει αναπτυχθεί θεαματικά τα τελευταία χρόνια, με μεγάλες ποσότητες λαχανικών να εισάγονται στα διάφορα κράτη, πράγμα το οποίο καθιστά δύσκολους όμως τους ελέγχους τροφίμων. Το γεγονός αυτό καθώς και η τάση των ανθρώπων για κατανάλωση περισσότερων RTE (ready-to-eat) τροφίμων (στα οποία ανήκουν και τα λαχανικά), είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των κρουσμάτων τροφικών δηλητηριάσεων που συνδέονται με αυτά τα προϊόντα (Beuchat, 1996; Beuchat, 2002; Tauxe *et al.*, 1997; Sewell and Farber, 2001; Horby *et al.*, 2003; Sivapalasingam *et al.*, 2004; Doyle and Erickson, 2008; Lienemann *et al.*, 2008; Berger *et al.*, 2010; FAO/WHO, 2008).



**Εικόνα 1.1:** Ημερήσια κατανάλωση λαχανικών σε ενήλικες το 2012 (ή σε κοντινή χρονιά). (Πηγή:OECD Health Statistics, 2014).

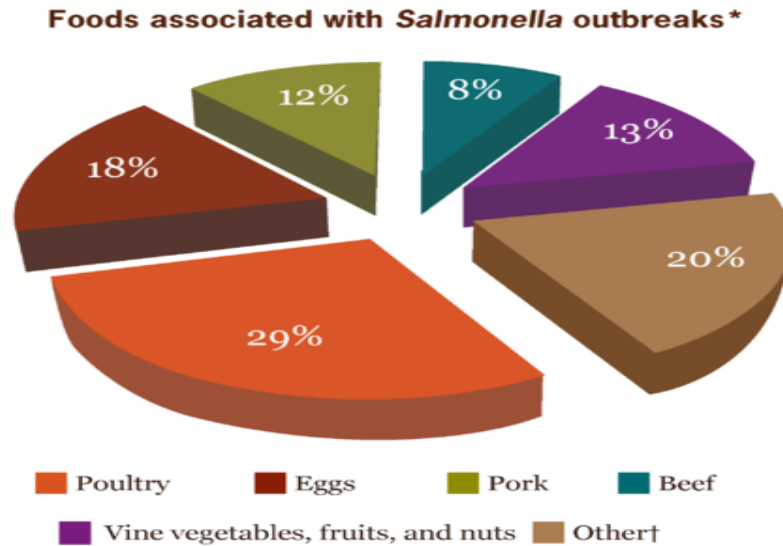
Άλλωστε, η ανάπτυξη ενός ενιαίου προτύπου αξιολόγησης για την εξασφάλιση της ασφάλειας των φρούτων και λαχανικών κρίνεται ως αρκετά δύσκολη λόγω της μεγάλης ποικιλίας των προϊόντων αυτών ως προς τη δομή, τη φυσιολογία και άλλα χαρακτηριστικά τους. Ορισμένα δε από αυτά αποτελούν συνδυασμό νωπών προϊόντων, όπως η σαλάτα, όντας ιδιαίτερα ευαίσθητα σε διακυμάνσεις της θερμοκρασίας, και έχοντας συνήθως μια σύντομη διάρκεια ζωής στο ράφι. Επιπλέον, οι θρεπτικές ουσίες

απελευθερώνονται νωρίτερα στις προκομμένες σαλάτες με αποτέλεσμα τον ταχύτερο πολλαπλασιασμό των βακτηρίων (Nguyen, 1994), ενώ οι διαδικασίες κοπής και συσκευασίας ελλοχεύουν τον κίνδυνο να εισαγάγουν μικροβιακές προσμείξεις, αν τα σκεύη ή ο εξοπλισμός έχουν επιμολυνθεί (Beuchat, 2007).

Σύμφωνα με έρευνες που έχουν γίνει, πληθώρα παθογόνων μικροοργανισμών έχουν εντοπιστεί σε φρούτα και λαχανικά. Πιο συγκεκριμένα, έχουν απομονωθεί παθογόνα βακτήρια όπως *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophilla* (Buck *et al.*, 2003), *Yersinia enterocolitica* και *Listeria monocytogenes*, βακτήρια τα οποία προκαλούν σήψη όπως *Pseudomonas fluorescens*, ιοί όπως *Norwalk-like* και *hepatitis A* (Koopmans and Duizer, 2004), παράσιτα όπως *Cryptosporidium* και *Cyclospora* (Monge and Chinchilla, 1996; Nguyen and Carlin, 2000), μύκητες και ζύμες όπως *Fusarium*, *Alternaria*, *Phoma*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus* και *Aspergillus* (Azeredo *et al.*, 2011; Tournas, 2005; Abadias *et al.*, 2008).

### **1.1.1 Καταγεγραμμένα κρούσματα *Salmonella* spp. σε λαχανικά**

Από το 1990 έως το 2005, φρέσκα λαχανικά συσχετίστηκαν με 713 κρούσματα, με αποτέλεσμα 34.049 περιπτώσεις ασθενειών (Anon, 2007). Ο αριθμός των κρουσμάτων που προκλήθηκαν από *Salmonella* spp. και οφειλόταν στην κατανάλωση λαχανικών ξεπέρασε εκείνους για όλα τα άλλα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένου των πουλερικών, του μοσχαριού, των αυγών και των θαλασσινών (Εικόνα 1.2). Προϊόντα που είχαν υποστεί κοπή (pre-cut) είχαν το υψηλότερο επίπεδο επιμόλυνσης (Westrell *et al.*, 2009). Ενδεικτικά, ο παθογόνος μικροοργανισμός έχει απομονωθεί από διάφορα είδη φρούτων, χυμούς και λαχανικά, όπως οι αγκινάρες, τα φύλλα τεύτλων, το σέλινο, το λάχανο, το πεπόνι, το κουνουπίδι, η μελιτζάνα, το αντίδι, ο μάραθος, τα πράσινα κρεμμύδια, το μαρούλι, το φασόλι, το κάρδαμο, ο χυμός πορτοκαλιού, ο μαϊντανός, το πιπέρι, το σπανάκι, οι φράουλες, οι ντομάτες, το καρπούζι (Buck *et al.*, 2003).



**Εικόνα 1.2:** Τρόφιμα τα οποία σχετίζονται με κρούσματα από *Salmonella* spp. (\* αυτά τα μολυσμένα συστατικά ή τρόφιμα σχετίζονται με το 1/3 των κρουσμάτων από *Salmonella* spp. στις Η.Π.Α.) Other: Περιλαμβάνει φύτρες, πράσινα φυλλώδη λαχανικά, ρίζες, σπόρους φασολιών, οστρακοειδή και γαλακτοκομικά. Πηγή: (CDC National Outbreak Reporting System, 2004-2008).

Η νόσος που προκαλεί ο παθογόνος μικροοργανισμός ονομάζεται σαλμονέλωση. Ο δηλωμένος αριθμός των περιστατικών που σχετίζονται με τη νόσο είναι υψηλότερος στη Βόρεια Αμερική και την Ευρώπη, πιθανότατα λόγω των αποτελεσματικότερων συστημάτων επιτήρησης (Hernman, 2008). Κάθε χρόνο περίπου, 1,4 εκατομμύρια ανθρώπινες λοιμώξεις από *Salmonella* καταγράφονται στις Ηνωμένες Πολιτείες με το δεδομένο ότι μόνο 2% των περιπτώσεων αναφέρεται στο Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC) (Cummings *et al*, 2010; Mead *et al*, 1999; Turner, 2010), ενώ σε μη αναπτυσσόμενες χώρες τα ποσοστά είναι σαφώς υψηλότερα, όμως δεν υπάρχουν άμεσα διαθέσιμα δεδομένα. Το εκτιμώμενο συνολικό κόστος που συνδέεται με τις επιπτώσεις της ασθένειας κυμαίνεται μέχρι αρκετά δισεκατομμύρια δολάρια (Frenzen *et al.*, 1999; WHO, 2005), με το ετήσιο κόστος για ένα πρόγραμμα ελέγχου του παθογόνου να αυξάνεται ολοένα σε ορισμένες χώρες (WHO, 2005). Σε ότι αφορά το μέσο όρο των καταγεγραμμένων περιστατικών στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (εκτός της

Ολλανδίας και της Ισπανίας) και στις χώρες της ΕΕΑ/ΕΦΤΑ (European Economic Area/European Free Trade Association), σύμφωνα με τα τελευταία δημοσιευμένα δεδομένα, ήταν 29,8 κρούσματα ανά 100.000 κατοίκους το 2008. Το *Salmonella* spp. αποτελεί το δεύτερο συχνότερο βακτηριακό αίτιο τροφιμογενών λοιμώξεων στην Ευρώπη μετά το *Campylobacter* spp. και το κύριο βακτηριακό αίτιο επιδημιών τροφιμογενούς αιτιολογίας, ενώ είναι ένα από τα συχνότερα αίτια της διάρροιας των ταξιδιωτών. Σε ότι αφορά την Ελλάδα, με βάση το σύστημα υποχρεωτικής δήλωσης νοσημάτων, για τα έτη 2000-2010, καταγράφηκαν κατά μέσο όρο 6,6 κρούσματα ανά 100.000 πληθυσμού (ΚΕΛΠΝΟ). Τα κρούσματα στην χώρα μας παρουσιάζουν υψηλότερη δηλούμενη συχνότητα στα παιδιά και ιδιαίτερα στην ηλικιακή ομάδα 0-4 έτη και σαφή εποχική κατανομή, με αύξηση τους καλοκαιρινούς μήνες.

Το μεγαλύτερο ποσοστό των καταγεγραμμένων κρουσμάτων σχετίζεται με την κατανάλωση τροφίμων κατ'οίκον (περίπου 80%), ενώ μικρότερα ποσοστά αναφέρονται σε κρούσματα σε κέντρα μαζικής εστίασης (σχολεία, νοσοκομεία, εστιατόρια) (Guiney *et al.*, 1995). Η μολυσματική δόση του *Salmonella* εξαρτάται από τον ορότυπο, το στέλεχος του βακτηρίου, την φάση της ανάπτυξης και την ευαισθησία του ξενιστή. Από την άλλη πλευρά, οι παράγοντες του ξενιστή που ελέγχουν την ευαισθησία σε λοιμώξεις περιλαμβάνουν την κατάσταση του εντερικού σωλήνα, την ηλικία, τα ήδη υπάρχοντα νοσήματα ή τις ανοσοανεπάρκειες. Η μολυσματική δόση του παθογόνου κυμαίνεται από 1 έως  $10^9$  CFU/g. Ωστόσο, κρούσματα με πηγή ένα μόνο τρόφιμο δείχνουν ότι μόλις 1 έως 10 κύτταρα μπορούν να προκαλέσουν μόλυνση στις πιο ευπαθείς ομάδες YOPIs (Young, Old, Pregnant, Immuno-compromised) (Youself and Calstrom, 2003; Bhunia, 2008).

Παραδείγματα καταγεγραμμένων κρουσμάτων αποτελούν τα παρακάτω:

- Το 1899, ένα κρούσμα τυφοειδούς πυρετού σε ένα άσυλο της Μασαχουσέτης είχε σαν αποτέλεσμα 40 άρρωστους κρατούμενους για ένα χρονικό διάστημα 2 εβδομάδων και συνδέθηκε με την κατανάλωση σέλινου (Morse, 1899). Το 1991, καταγράφηκε και δεύτερο κρούσμα οξείας γαστρεντερίτιδας σε 1440 δόκιμους στις Αεροπορικές Βάσεις των ΗΠΑ που οφειλόταν σε κύβους σέλινου που περιέχονταν σε σαλάτα κοτόπουλου (Warner *et al.*, 1991).



- Το 2004, κρούσμα από *Salmonella* Thompson καταγράφηκε στη Νορβηγία, στη Σουηδία και στην Αγγλία. Το περιστατικό αυτό συνδέθηκε με κατανάλωση μολυσμένου μαρουλιού εισαγόμενου από την Ιταλία (Nygard *et al.*, 2008). Την ίδια χρονολογία στο Ηνωμένο Βασίλειο και στην Ιρλανδία σημειώθηκε ακόμα ένα κρούσμα σε μαρούλι από τον ορότυπο *S.* Newport, με αποτέλεσμα να καταγραφούν 807 περιστατικά. Το 2005, 60 επιβεβαιωμένα περιστατικά σαλμονέλλωσης καταγράφηκαν σε εθνικό επίπεδο στη Φιλανδία από την παρουσία *S.* Typhimurium var Copenhagen DT104B σε εισαγόμενο μαρούλι από την Ισπανία (Takkinen *et al.*, 2005). Πιο πρόσφατο κρούσμα από *S.* Enteritidis που οφειλόταν σε κατανάλωση μαρουλιού καταγράφηκε το 2012 σε εστιατόριο και οφειλόταν σε κακή υγιεινή του προσωπικού (Severi *et al.*, 2012).
- Σε φύτες λαχανικών το 2005 εντοπίστηκε *S.* Enteritidis στον Καναδά σημειώνοντας 592 περιστατικά.
- Το 2007 στην Ευρώπη σημειώθηκαν 354 περιστατικά από την κατανάλωση σπανακιού που ήταν μολυσμένο με *Salmonella* spp.
- Κρούσμα από *S.* enterica serovar Seftenberg τον Ιούνιο του 2007 εντοπίστηκε σε βασιλικό εισαγόμενο από το Πακιστάν στην Αγγλία, τη Σκωτία, τη Δανία και την Ολλανδία και είχε ως αποτέλεσμα 51 περιστατικά, 3 νοσηλείες. Άλλο ένα κρούσμα από *S.* anatum από εισαγόμενο βασιλικό στη Δανία καταγράφηκε το 2009 (Pakalniskiene *et al.*, 2009).
- Καταγεγραμμένα κρούσματα από *S.* enterica σε πράσινα φυλλώδη υπήρξαν και στην Ευρώπη το 2009 (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2009).
- Συχνά κρούσματα έχουν καταγραφεί σε φύτες λαχάνων (alfalfa) όπως αυτά από τον ορότυπο *S.* Weltegeden στη Νορβηγία, τη Δανία και τη Σουηδία το 2007 (Emberland *et al.*, 2007), που οφείλονταν σε μολυσμένους σπόρους του λαχανικού που εισήλθαν από το Πακιστάν. Ο ορότυπος *Salmonella* Saintpaul εντοπίστηκε το 2009 στις Η.Π.Α σε φύτες λάχανων σημειώνοντας 235 περιστατικά. Άλλα περιστατικά στο συγκεκριμένο λαχανικό σημειώθηκαν από τους ορότυπους *Salmonella* I και *Salmonella* Newport το 2010 και από τον ορότυπο *Salmonella* Enteritidis το 2011 (CDC, 2009, 2010, 2011).

### **1.1.2 Νομοθεσία- Ευρωπαϊκός κανονισμός**

Σύμφωνα με τον ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα, σημειώνεται ότι πρέπει να υπάρχει απουσία *Salmonella* spp. σε 25g κομμένων φρούτων και λαχανικών τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων με μέθοδο αναφοράς EN/ISO 6579. Το στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο είναι από τη διάθεση στην αγορά και κατά τη διάρκεια διατήρησης των τροφίμων.

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

#### **1.2.1 Ιστορικά στοιχεία για την ανακάλυψη της *Salmonella* spp.**

Τα περισσότερα στελέχη του γένους *Salmonella* spp. θεωρούνται ως ανθρώπινα παθογόνα παρόλο που διαφέρουν ως προς τα χαρακτηριστικά και την ένταση της ασθένειας που προκαλούν. Σύμφωνα με τον Bhunia (2008) έχουν καταγραφεί παγκοσμίως, 16 εκατομμύρια ετήσιες περιπτώσεις τυφοειδούς πυρετού, 1,3 δισεκατομμύρια περιπτώσεις γαστρεντερίτιδας και 3 εκατομμύρια θάνατοι που οφείλονται στον παθογόνο αυτό μικροοργανισμό. Ο τυφοειδής πυρετός είναι το πιο δριμύ αλλά και το πρώτο χαρακτηριστικό της μόλυνσης από *Salmonella* που περιγράφηκε αξιόπιστα από το Γάλλο παθολόγο Brettoneau το 1829. Λίγο αργότερα το 1856, ο Άγγλος παθολόγος William Budd κατέληξε στο συμπέρασμα ότι κάθε περίπτωση τυφοειδούς προσβολής συνδέεται επιδημιολογικά με μια προηγούμενη περίπτωση και ότι μια συγκεκριμένη τοξίνη αποβάλλεται από τα περιττώματα των ασθενών. Ο τυφοειδής βάκιλος παρατηρήθηκε αρχικά από τους Γερμανούς βακτηριολόγους Eberth και Koch το 1880 και τέσσερα χρόνια αργότερα ο Gaffky πέτυχε την καλλιέργεια του. Το 1885, οι Salmon και Smith απομόνωσαν το μικροοργανισμό *Bacillus cholerae-suis* από άρρωστους χοίρους που είχαν προσβληθεί με χολέρα (μια ασθένεια που τώρα είναι γνωστό ότι έχει ιογενή προέλευση) καθώς και μια πληθώρα άλλων στελεχών που προκαλούσαν τροφιμογενείς ασθένειες και ζωικές προσβολές. Το γένος *Salmonella* spp. «ανακαλύφθηκε» τελικά το 1900 από τον Lignieres και ονομάστηκε έτσι προς τιμήν του

αμερικανού παθολόγου κτηνίατρου D. E Salmon, που πρώτος περιέγραψε το μικροοργανισμό *Salmonella cholera-suis*.

Μέχρι και τη δεκαετία του 1940, ο *S. typhi* και ο *S. paratyphi* ήταν οι κύριες αιτίες της σαλμονέλωσης σε όλο τον κόσμο. Ωστόσο, με την παστερίωση του γάλακτος και με τη χλωρίωση του πόσιμου νερού, η εξάπλωση του τυφοειδούς και παρατυφοειδούς πυρετού μέσω των τροφίμων και του νερού μειώθηκε πολύ, τουλάχιστον στις ανεπτυγμένες χώρες. Μετά την ανάπτυξη αποτελεσματικών τεχνικών για την απομόνωση και την ταυτοποίηση των υπόλοιπων ορότυπων του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. από δείγματα τροφίμων και του περιβάλλοντος, έγινε εμφανές ότι η παγκόσμια συχνότητα εμφάνισης της τροφιμογενούς σαλμονέλωσης που προκαλείται από άλλους ορότυπους του παθογόνου *Salmonella* spp. είναι αρκετά υψηλή. Τη δεκαετία του 1950, αναγνωρίστηκε ότι η τροφιμογενής σαλμονέλωση υπήρξε η κύρια αιτία όλων των τροφιμογενών ασθενειών από παθογόνα βακτήρια και ιούς. Σήμερα έχει καθιερωθεί ως μία από τις σημαντικότερες αιτίες τροφιμογενούς ασθένειας παγκοσμίως.

### **1.2.2 Μελέτη του γένους *Salmonella***

Το γένος *Salmonella* έχει ευρεία εξάπλωση και έχει πλέον καθιερωθεί ως μια από τις σημαντικότερες αιτίες πρόκλησης τροφιμογενών ασθενειών παγκοσμίως, τα τελευταία 100 χρόνια (Chalker and Blaser, 1988; Coburn, Grassl and Finlay, 2007; Alakomi and Saarela, 2009). Ανιχνεύεται στο εντερικό σύστημα των ζώων και του ανθρώπου (Critzler and Doyle, 2010; Adley *et al.*, 2011; Rostagno and Callaway, 2011), στα κόπρανα, στα ούρα, στα τρόφιμα και στις ζωοτροφές. Μέχρι στιγμής έχουν περιγραφεί πολλοί ορότυποι του γένους *Salmonella*. Το σχέδιο ταξινόμησης ανά ορότυπο των Kauffman-White (Πίνακας 1.1) έχει αποδειχτεί η πιο χρήσιμη τεχνική για ορισμό διαφοροποιήσεων εντός του γένους. Αυτή η τεχνική περιγράφει τους μικροοργανισμούς βάσει των σωματικών αντιγόνων τους (O) και των αντιγόνων των μαστιγίων (H) αλλά και βάσει των αντιγόνων των καψιδίων (Vi) που διαθέτουν τα στελέχη *S. typhi*, *S. dublin* και σε μερικές περιπτώσεις τα στελέχη *S. paratyphi*. Σήμερα αυτή η ταξινόμηση διακρίνει παραπάνω από 2500 ορότυπους (Fierer and Guiney, 2001) από τους οποίους οι

περισσότεροι ανήκουν στο υποείδος *Salmonella enterica* (Kaufmann, 1966). Σύμφωνα με τους Le Minor και Poroff (1987), ο όρος *Salmonella* αναφέρεται στο γένος του μικροοργανισμού που περιλαμβάνει δύο είδη: τον *Salmonella enterica* και τον *Salmonella bongori*. Ο *Salmonella enterica* διαιρείται σε 6 υποείδη: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* και *indica*. Μεταξύ των έξι υποειδών, το *Salmonella enterica* subsp. *enterica* περιλαμβάνει τους περισσότερους ορότυπους που συνδέονται συχνά με την τροφιμογενή σαλμονέλωση. Οι ορότυποι του παθογόνου βρέθηκε ότι έχουν υψηλό βαθμό συγγένειας στο DNA και αποτελούν μια ενιαία ομάδα υβριδοποίησης.

**Πίνακας 1.1:** Το σχέδιο ταξινόμησης ανά ορότυπο των Kauffman-White. Πηγή:(Monteville and Matthews, 2005; Μπαλατσούρας, 2006).

<b>Πίνακας 1</b> Είδη σαλμονέλων, υποείδη, ορότυποι, και οι συνηθισμένοι βιότοποί τους ,σχέδιο Kaufmann-White		
Είδη και υποείδη σαλμονέλων	Αριθμός ορότυπων στα υποείδη	Συνηθισμένος Βιότοπος
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1454	Θερμόαιμα ζώα
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	489	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	94	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	324	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	70	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	12	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. bongori</i> (V)	20	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
Total	2463	

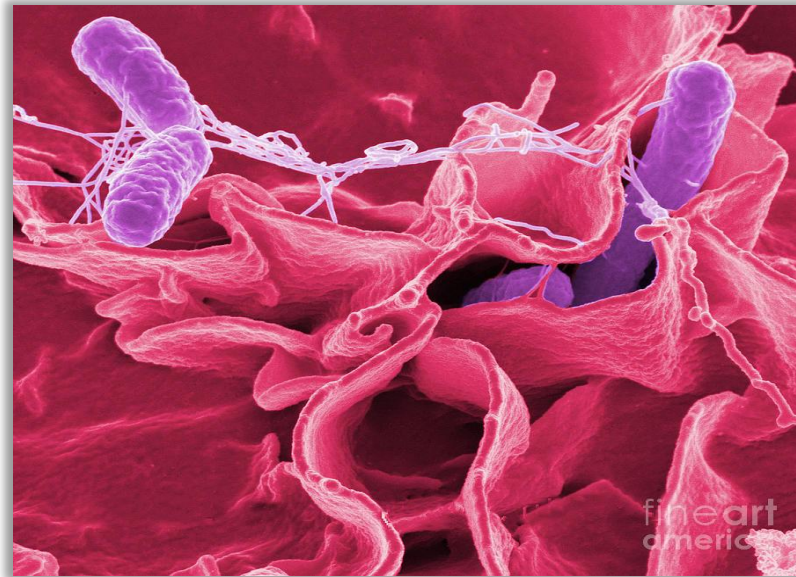
Το γένος *Salmonella* ομαδοποιείται επίσης, με βάση την ευαισθησία του σε συγκεκριμένους τύπους βακτηριοφάγων (PT) και ορίζεται ως PT4, PT8, PT13, PT13a, PT23, DTI04 (ορότυπος) κ.α.

Σε ότι αφορά την επιδημιολογική ταξινόμηση του παθογόνου βασίζεται στην προτίμηση του ξενιστή και περιλαμβάνει τρεις ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει ορότυπους με περιορισμένες επιλογές ξενιστή (host-restricted) που προσβάλλουν μόνο τον άνθρωπο, όπως ο *S. typhi*. Η δεύτερη ομάδα αποτελείται από ορότυπους που προσαρμόζονται στον ξενιστή (host-adapted) και συνδέονται με ένα είδος ξενιστή, αλλά μπορεί να προκαλέσει νόσο και σε ορότυπους άλλων ξενιστών, όπως ο *S. pullorum* στα πουλερικά. Η τρίτη ομάδα περιλαμβάνει τους υπόλοιπους ορότυπους. Συνήθως, οι παθογόνοι *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium και *Salmonella* Heidelberg είναι οι τρεις πιο συχνοί ορότυποι που απομονώνονται κάθε χρόνο από τους ανθρώπους (Gray and Fedorka-Cray, 2002; Boyen *et al*, 2008).

### **1.2.3 Ο μικροοργανισμός και τα χαρακτηριστικά του**

Το γένος *Salmonella* spp. ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae (Le Minor, 1984) και περιλαμβάνει αρνητικά κατά Gram, προαιρετικά αναερόβια ή αερόβια μαστιγοφόρα ραβδοειδή βακτήρια, των οποίων το μέγεθος είναι 2-3 x 0.4-0.6 μm (Yousef and Carlstrom, 2003; Montville and Matthews, 2008). Παρόλα αυτά έχουν εντοπιστεί και ορισμένοι ορότυποι που φέρουν ειδικό ελυτροειδές περίβλημα (*S. typhi*, *S. paratyphi*) καθώς και κάποιοι που στερούνται ικανότητα κίνησης (*S. pullorum*). Σε ότι αφορά τη θερμοκρασία, τα όρια ανάπτυξης κυμαίνονται από 5,1 °C έως 45-47 °C (Simonsen *et al*, 1987) (τιμή optimum 37 °C). Παρόλα αυτά τα κύτταρα του παθογόνου μπορούν να επιβιώσουν και υπό συνθήκες συντήρησης καθώς και σε συνθήκες κατάψυξης (Cox, 2000). Ο μικροοργανισμός είναι θερμοευαίσθητος και καταστρέφεται εύκολα από τις θερμοκρασίες της παστερίωσης (Monteville and Matthews, 2005; Ray, 2005; Mackzulack, 2011). Όσον αφορά τις ανάγκες του σε παρουσία νερού, *Salmonella* αναπτύσσεται σε περιβάλλον με aw > 0,93 - 0,95. Παρόλο που η ελάχιστη aw που επιτρέπει την αύξηση είναι το 0,93, τα κύτταρα του επιζούν καλά στα ξηρά τρόφιμα με το ποσοστό επιβίωσης να αυξάνεται καθώς η aw μειώνεται. Επιπλέον, πολλαπλασιάζεται σε εύρος pH από 4,0 – 5,4 έως 9,0 (τιμή optimum 6,5 - 7,5) ενώ σε τιμές μικρότερες του 4,0 επέρχεται αδρανοποίηση και θάνατος των κυττάρων του. Ο μικροοργανισμός χαρακτηρίζεται ως ανθεκτικός σε συγκέντρωση άλατος από 4% έως 8%. Πλήρης

παρεμπόδιση της ανάπτυξης του παρατηρείται σε θερμοκρασίες <math><7\text{ }^\circ\text{C}</math>, <math>\text{pH} <3,8</math> ή <math>a\_w <0,94</math> (Hanes, 2003; Bhunia, 2008).



**Εικόνα 1.3:** Απεικόνιση των βακίλων του βακτηρίου *Salmonella* spp. κατά την επίθεση τους σε ανθρώπινο ιστό. Η φωτογραφία έχει παρθεί με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM). (Πηγή: <http://fineartamerica.com/featured/10-salmonella-bacteria-science-source.html>)

Τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Salmonella* είναι χημειοαυτότροφα και έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν την τροφή τους, τόσο με την αναπνοή όσο και με τη ζύμωση. Αυξάνονται σε υποστρώματα που περιέχουν D-γλυκόζη, αλλά και άλλους υδατάνθρακες, τους οποίους καταβολίζουν-ζυμώνουν με την ταυτόχρονη παραγωγή αερίου. Είναι αρνητικά στη δοκιμή της οξειδάσης και θετικά στην δοκιμή της καταλάσης, αρνητικά στις δοκιμές της ινδόλης και τη Voges-Proskauer και θετικά στις δοκιμές ερυθρού του μεθυλίου και της χρησιμοποίησης των κιτρικών αλάτων του Simmon (Holt, 1974). Παράγουν  $\text{H}_2\text{S}$  και δεν υδρολύουν την ουρία (D' Aoust *et al.*, 1989; Anonymous, 1990; Ray and Sandine, 1992). Οι υδατάνθρακες που συνήθως ζυμώνονται

είναι οι εξής: α) L- αραβινόζη, β) μαλτόζη, γ) D-μανιτόλη, δ) D-μανόζη, ε) L- ραμνόζη, στ) D-σορβιτόλη, ζ) D-ξυλόζη, και η) τρεχαλόζη.

Οι υδατάνθρακες αυτοί φέρουν σημαντικά αντιγόνα που είναι συστατικά του κυττάρου και διακρίνονται στα σωματικά αντιγόνα (αντιγόνα O), βλεφαριδικά αντιγόνα (αντιγόνα H) και αντιγόνα κάψας (αντιγόνα K).

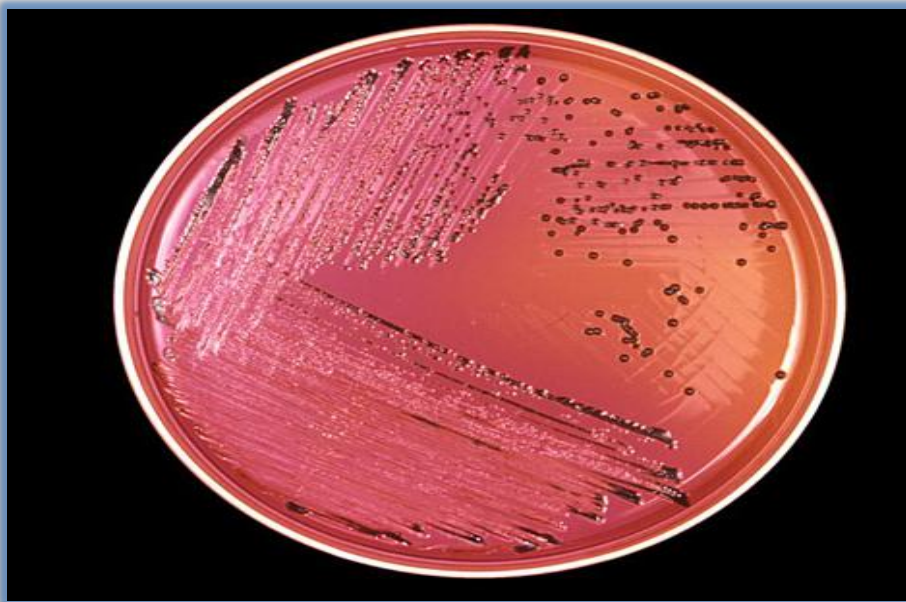
➤ Σωματικά αντιγόνα (αντιγόνα O). Αποτελούν συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος και συγκεκριμένα είναι λιποπολυσακχαρίτες. Είναι ανθεκτικά (2 ½ ώρες σε 100°C) και δεν καταστρέφονται από την αλκοόλη και τα οξέα. Αποτελούνται από διάφορα αντιγονικά συστατικά που χαρακτηρίζονται με αραβικούς αριθμούς.

➤ Βλεφαριδικά αντιγόνα (αντιγόνα H). Ουσίες πρωτεϊνικής φύσεως, ευαίσθητες στη θερμότητα, στην αλκοόλη και στα οξέα. Τα βλεφαριδικά αντιγόνα αποτελούνται από περισσότερα αντιγονικά συστατικά σε σχέση με τα σωματικά αντιγόνα. Οι διάφοροι ορότυποι του γένους *Salmonella* έχουν διαφορετικό συνδυασμό αντιγονικών συστατικών, τα οποία χωρίζονται σε δύο είδη που ονομάζονται φάση 1 (ειδική φάση) και φάση 2 (μη ειδική φάση) (Kauffmann-White). Ένας ορότυπος *Salmonella* είναι δυνατό να έχει αντιγόνα μόνο της μίας φάσης, όπως ο *S. Enteritidis*, ή να έχει αντιγόνα και των δύο φάσεων, όπως ο *S. Typhimurium* και ο *S. cholerae-suis*. Οι *S. gallinarum* και *S. pullorum*, στερούνται βλεφαριδίων, επομένως δεν έχουν βλεφαριδικά αντιγόνα.

➤ Αντιγόνα κάψας (αντιγόνα K). Τα αντιγόνα αυτά παρατηρούνται μόνο στους παθογόνους για τον άνθρωπο ορότυπους *S. typhi* και *S. paratyphi*. Είναι αντιγόνα του βακτηριακού ελύτρου, πολυσακχαριδικής φύσεως. Εμποδίζουν τον προσδιορισμό του αντιγόνου O, επειδή περιβάλλουν το κυτταρικό τοίχωμα. Για το λόγο αυτό πριν από την ταυτοποίηση του αντιγόνου O πρέπει να προηγηθεί καταστροφή των αντιγόνων της κάψας με κατάλληλο τρόπο. Από τα περισσότερα γνωστά αντιγόνα του ελύτρου, είναι το αντιγόνο Vi (ονομασία που προέρχεται από τη λέξη Virulent =λοιμογόνος). Καταστρέφεται υπό την επίδραση της φαινόλης όταν θερμανθεί στους 60°C για μία ώρα. Τα είδη του γένους *Salmonella* που έχουν το αντιγόνο Vi θεωρούνται περισσότερο λοιμογόνα (Moise, 1978). Στο γένος *Salmonella* η λεπτομερής ανάλυση των αντιγόνων O και H είχε σαν αποτέλεσμα την αναγνώριση πολλών εκατοντάδων διαφορετικών ορότυπων. Η αντιγονική αυτή ταυτοποίηση αν και δεν έχει μεγάλη ταξινομική αξία είναι

σημαντική από επιδημιολογική άποψη. Ο ορότυπος ενός παθογονικού στελέχους *Salmonella*, αποτελεί δείκτη αναγνώρισης του και έτσι γίνεται δυνατή η παρακολούθηση και ταυτοποίηση του στελέχους σε περιπτώσεις μαζικών τροφικών δηλητηριάσεων.

Το παθογόνο *Salmonella* είναι ανθεκτικός μικροοργανισμός και επιζεί ακόμη και όταν στερείται των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών για το μεταβολισμό του. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η ανθεκτικότητα του σε ορισμένες χρωστικές και χημικές ουσίες που αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων βακτηρίων. Όπως σε όλα τα Gram-αρνητικά βακτήρια, το κυτταρικό τοίχωμα τους περιέχει λιποπολυσακχαρίτες. Με τη λύση των κυττάρων οι λιποπολυσακχαρίτες ελευθερώνονται και ενεργούν ως ενδοτοξίνες. Ο μικροοργανισμός δεν παράγει εξωτοξίνες και ο μηχανισμός παθογένειας του φαίνεται ότι έχει σχέση με το O αντιγόνο του που δρα ως ενδοτοξίνη (Holt, 2000).



**Εικόνα 1.4:** Αποικίες του μικροοργανισμού *Salmonella* σε υπόστρωμα XLD.

#### **1.2.4 Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά**

Ο μικροοργανισμός *Salmonella* spp. είναι υπεύθυνος για έναν αριθμό διαφορετικών κλινικών συμπτωμάτων:

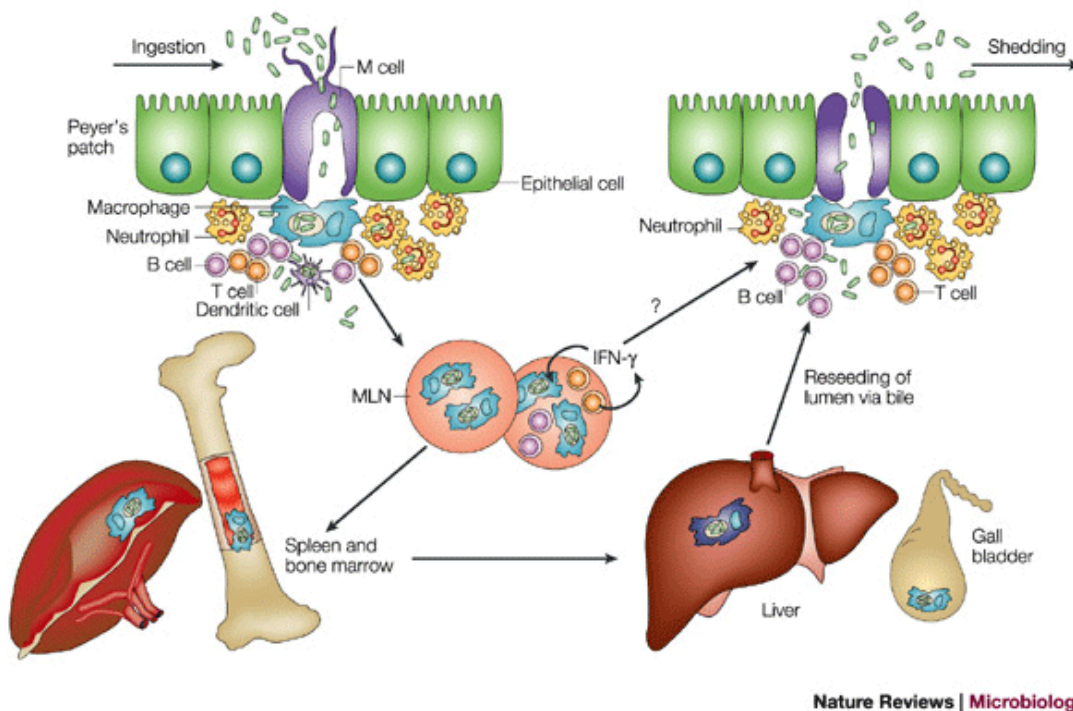


Εντερίτιδα. Οι γαστρεντερικές μολύνσεις είναι κυρίως συνδεδεμένες με εκείνους τους ορότυπους που εμφανίζονται ευρέως στα ζώα και τους ανθρώπους. Μπορούν να κυμανθούν από πλευράς δριμύτητας από ασυμπτωματική μεταφορά μέχρι διάρροια που είναι και ο πιο κοινός τύπος σαλμονέλωσης. Η περίοδος επώασης για εντερίτιδα είναι μεταξύ 6 και 48 ωρών. Τα κύρια συμπτώματα της ασθένειας είναι ήπιος πυρετός, ναυτία, εμετός, κοιλιακοί πόνοι και διάρροια. Διαρκούν συνήθως για 2-3 ημέρες αλλά σε μερικές περιπτώσεις, μπορούν να εμείνουν για μια εβδομάδα ή περισσότερο. Η ασθένεια συνήθως περιορίζεται από μόνη της με την πάροδο του χρόνου αλλά μπορεί να καταστεί πιο σοβαρή στις ιδιαίτερα ευαίσθητες ομάδες πληθυσμού, όπως στους πολύ νέους, στους πολύ ηλικιωμένους, στις εγκύους και στους ήδη ασθενείς (D' Aoust *et al.*, 1989; Andrews and Baumler, 2005). Ο μικροοργανισμός εισέρχεται στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της κατάποσης και αφού κατορθώσει να επιζήσει στο όξινο περιβάλλον του στομάχου ξεπερνώντας τον ανταγωνισμό με τη φυσική χλωρίδα (Grassl, 2008), προσκολλάται στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Στη συνέχεια εισάγεται εντός των κυττάρων με μια διαδικασία γνωστή ως ενδοκύτωση μέσω δέκτη (receptor mediated endocytosis). Η ικανότητα του *Salmonella* spp. να εισάγεται σε μη φαγοκυτταρικά κύτταρα προσδίδει ουσιαστική δυναμικότητα στην παθογένειά του. Η διαδικασία αυτή οφείλεται κυρίως στην κωδικοποίηση μιας περιοχής 35-40 kb του χρωμοσώματος, που περιγράφεται ως περιοχή παθογένειας. Αυτή η περιοχή του DNA κωδικοποιεί ένα σύνθετο σύστημα έκκρισης πρωτεϊνών, γνωστό ως σύστημα έκκρισης τύπου III, που απαιτείται για την αποστολή σημάτων που αποσυντονίζουν τα κύτταρα του ξενιστή και τελικά οδηγούν στην είσοδο των βακτηριακών κυττάρων. Το παθογόνο βακτήριο που έχει εισαχθεί με ενδοκύτωση περνά μέσα στα επιθηλιακά κύτταρα διαμέσου ενός συνδεδεμένου στη μεμβράνη χυμοτοπίου, όπου πολλαπλασιάζεται και απελευθερώνεται έπειτα στο μεμβρανώδες βλεννογόνο. Αυτό προκαλεί μια ροή φλεγμονωδών κυττάρων που οδηγούν στην απελευθέρωση προσταγλαδινών που ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση η οποία προκαλεί έκκριση ρευστών στον εντερικό αυλό, με αποτέλεσμα το σύμπτωμα της διάρροιας.

Συστηματική νόσος. Οι ορότυποι *Salmonella* spp. που προσαρμόζονται ανάλογα με τον ξενιστή είναι πιο επιθετικοί και τείνουν να προκαλέσουν συστηματικές νόσους στους ξενιστές τους, ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα τους που συνδέεται με την ανθεκτικότητά

τους στην καταπολέμηση από τα φαγοκύτταρα. Στους ανθρώπους, αυτό ισχύει για τους τυφοειδείς και παρατυφοειδείς βακίλους *S. typhi* και *S. paratyphi* A, B, και C, οι οποίοι προκαλούν σηψαιμικές ασθένειες και εντερικό πυρετό. Ο τυφοειδής πυρετός έχει μια περίοδο επώασης από 3 έως 56 ημέρες, αν και συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 10 και 20 ημερών. Ο επιτιθέμενος μικροοργανισμός *Salmonella* spp. διαπερνά το εντερικό επιθήλιο και έπειτα μεταφέρεται από τα λεμφικά κύτταρα στους μεσεντερικούς λεμφαδένες. Μετά από τον πολλαπλασιασμό του στα μακροφάγα, απελευθερώνεται στη ροή του αίματος και διαδίδεται σε ολόκληρο το σώμα. Παρόλο ότι αφαιρείται από το αίμα και πάλι με χρήση των μακροφάγων συνεχίζει να πολλαπλασιάζεται μέσα σε αυτά κάτι το οποίο έχει ως συνέπεια καταστροφή τελικά των μακροφάγων, τα οποία απελευθερώνουν με τη σειρά τους μεγάλους αριθμούς βακτηρίων στη ροή του αίματος προκαλώντας σηψαιμία. Κατά τη διάρκεια του δεύτερου σταδίου της ασθένειας, ο μικροοργανισμός φθάνει στη χοληδόχο κύστη όπου πολλαπλασιάζεται στη χολή. Η ροή μολυσμένης χολής επιμολύνει το λεπτό έντερο οπότε και προκαλείται φλεγμονή και έλκος. Ο πυρετός εμμένει με παράλληλη διάρροια κατά την οποία αποβάλλονται μεγάλες ποσότητες βακτηρίων. Σε σοβαρότερες περιπτώσεις, μπορεί να εμφανιστεί αιμορραγία των ελκών και διάτρηση του εντέρου που οδηγεί σε περιτονίτιδα. Σε ηπιότερες περιπτώσεις, τα έλκη θεραπεύονται και ο πυρετός πέφτει σταδιακά μετά από 4-5 εβδομάδες ανάρρωσης. Η μοριακή και γενετική βάση για την προσκόλληση και εισβολή του βακτηρίου *Salmonella* spp. εντός των κυττάρων των ξενιστών και η εν γένει παθογένειά της είναι και σύνθετη και ξεχωριστή. Τουλάχιστον 60 γονίδια είναι υπεύθυνα για τη λοιμωξιογόνο δράση του παθογόνου αυτού μικροοργανισμού (Groisman and Ochman, 1997). Αρκετά από αυτά τα γονίδια εδρεύουν ως οπερόνιο σε ένα μεγάλο πλασμίδιο κοινό για τους περισσότερους οροτύπους *Salmonella* spp. ενώ ακόμη ένας μεγάλος αριθμός βρίσκεται σε διάφορες περιοχές του χρωμοσώματος μέσα σε ζώνες παθογένειας (pathogenicity islands). Η ζώνη παθογένειας της οποίας η δράση έχει αναλυθεί περισσότερο είναι η SPI-1, μια περιοχή 40 kb που διαθέτει πάνω από 30 γονίδια και κωδικοποιεί δύο ρυθμιστικές πρωτεΐνες που επιτελούν διαφορετικούς ρόλους, την InvF και HilA. Επίσης κωδικοποιεί και τα στοιχεία του συστήματος έκκρισης τύπου III, που καλούνται Inv/SPA και είναι απαραίτητα για την προσβολή και τη λοιμωξιογόνο δράση της στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Μια δεύτερη ζώνη παθογένειας 40 kb, η SPI-2, έχει εντοπιστεί σε χρωμόσωμα στον ορότυπο

*S. enterica* serovar Typhimurium (Ochman *et al.*, 1996; Shea *et al.*, 1996). Η ζώνη SPI-2 που ευθύνεται για την πρόκληση συστηματικών νοσημάτων (systemic disease), περιέχει τουλάχιστον 17 γονίδια που κωδικοποιούν ένα ρυθμιστικό σύστημα δύο στοιχείων και ένα σύστημα έκκρισης τύπου III που καλείται σύστημα Spi/SsA. Αυτά τα συστήματα ξεχωρίζουν από πλευράς δομής και λειτουργίας από το σύστημα SPI-1 Inv/Spa και το σύστημα έκκρισης τύπου III που είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία και τη λειτουργία των μαστιγίων σε άλλα βακτηριακά γένη. Μια ακόμα περιοχή 7.8 kb η οποία εντοπίζεται στο μεγάλο πλασμίδιο λοιμωξιογόνου δράσης (large virulence plasmid) του βακτηρίου *Salmonella* ssp και κωδικοποιεί πέντε γονίδια *spvRABCD* είναι επίσης υπεύθυνη για τη λοιμωξιογόνο δράση του παθογόνου.



**Εικόνα 1.5:** Σχηματική απεικόνιση της συστηματικής λοίμωξης από *Salmonella enterica* serovar Typhi σε άνθρωπο. (Πηγή: Monack *et al.*, 2004)

### 1.3 Πηγές μόλυνσης των λαχανικών και ικανότητα εσωτερικοποίησης του παθογόνου

Παρόλο που τα φρέσκα λαχανικά περιέχουν μια φυσική μικροχλωρίδα, η οποία δεν ευθύνεται για την πρόκληση ασθενειών στον καταναλωτή, υπάρχουν πολλές

πιθανότητες αυτά να μολυνθούν κατά την καλλιέργεια, τη συγκομιδή, τη μεταφορά, την εμπορία καθώς και το χειρισμό τους, με παθογόνα βακτήρια τα οποία προέρχονται από τα ζώα ή τον άνθρωπο (Berger *et al.*, 2010). Τα παθογόνα βακτήρια έχουν την ικανότητα να εποικίζουν την επιφάνεια των φυτών-λαχανικών. Ωστόσο, μερικές φορές μπορούν να διεισδύσουν εντός του φυτικού ιστού και να εδραιωθούν εσωτερικά, μέσω μιας διαδικασίας που αναφέρεται ως μικροβιακή εσωτερικοποίηση. Η εσωτερικοποίηση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. εντός του ιστού πράσινων φυλλωδών λαχανικών έχει αποδειχθεί σε έρευνες των Gomes *et al.*, (2009), Kroupitsi *et al.*, (2009), Golberg *et al.*, (2011), και των Park *et al.*, (2012).

Οι κύριες πηγές επιμόλυνσης που σχετίζονται με την εσωτερικοποίηση του παθογόνου στα λαχανικά είναι: α) η επαφή με τα ζώα (κατοικίδια ή άγρια), β) η χρήση μη επεξεργασμένης ή ανεπαρκώς επεξεργασμένης κοπριάς, γ) η χρήση μολυσμένου νερού (για άρδευση ή χρήση φυτοφαρμάκων), δ) οι μολυσμένοι σπόροι, ε) η διασταυρούμενη επιμόλυνση από τους εργάτες ή τον εξοπλισμό κατά τη συγκομιδή ή μετά τη συγκομιδή, και στ) το μολυσμένο νερό πλυσίματος μετά τη συγκομιδή.

Σε ότι αφορά τη μεταφορά του *Salmonella* spp. σε φυλλώδη λαχανικά επιτυγχάνεται τόσο από τα οικόσιτα όσο και από τα άγρια ζώα (κυρίως πουλιά και ερπετά) (Harris *et al.*, 2003; Lowell *et al.*, 2010, Hilbert *et al.*, 2012), γεγονός αναμενόμενο αφού το παθογόνο βρίσκεται στο γαστρεντερικό σύστημα των θερμόαιμων ζώων με αποτέλεσμα να μεταφέρεται άμεσα ή έμμεσα στα φυτά (D'Aoust, 1988). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μόλυνση μαρουλιού από τον ορότυπο *Salmonella* Umbilo (που σπάνια βρίσκεται σε ανθρώπους) από περιττώματα βοοειδών. Τα έντομα είναι επίσης πιθανοί φορείς του παθογόνου με αποτέλεσμα τη μόλυνση των προϊόντων. Μελέτη των Talley *et al.*, (2009) έδειξε ότι μύγες μετέφεραν διάφορους μικροοργανισμούς σε φυλλώδη λαχανικά μέσω των περιττωμάτων τους.

Επιμόλυνση επίσης, μπορεί να προκύψει ως συνέπεια της επεξεργασίας του εδάφους με οργανικά λιπάσματα, όπως λυματολάσπη και κοπριά εάν αυτά δεν είναι καλά επεξεργασμένα πριν την χρήση τους με αποτέλεσμα να μεταφέρουν παθογόνα βακτήρια, παράσιτα και ιούς (Forshell and Ekesbo, 1993; Mawdsley *et al.*, 1995; Beuchat and Ryu, 1997; Olson, 2000; Horby *et al.*, 2003; Guan and Holley, 2003; Gerba and Smith, 2005; Brandl, 2006; Franz and van Bruggen, 2008; Falomir *et al.*, 2010; Strawn *et al.*,

2013b). Σύμφωνα με τους Bernstein *et al.*, (2007) εσωτερικοποίηση του παθογόνου *Salmonella* Newport παρατηρήθηκε σε φύλλα μαρουλιού ηλικίας 33 ημερών ύστερα από ανάμειξη του εδάφους ανάπτυξης με μολυσμένη κοπριά. Επιπλέον, σωροί κοπριάς που αποθηκεύτηκαν κοντά σε καλλιεργούμενα εδάφη αποτελούν άλλη μια πηγή επιμόλυνσης μέσω των εκροών, των σπονδυλωτών και των εντόμων φορέων και της σκόνης (Suslow *et al.*, 2003; Hutchison *et al.*, 2004; Brandl, 2006; James, 2006). Έρευνες που έγιναν σε εκτροφεία στο Ηνωμένο βασίλειο εντόπισαν την ύπαρξη του μικροοργανισμού στο 5% έως 18% των δειγμάτων ανάλογα με το είδος του ζώου, και τα θετικά δείγματα περιείχαν κατά μέσο όρο περίπου  $10^3$  CFU/g με τις μέγιστες τιμές να φτάνουν το  $10^6$  έως  $10^7$  CFU/g. Αξίζει να σημειωθεί, ότι το είδος της κοπριάς που χρησιμοποιείται (Park *et al.*, 2012) σχετίζεται με την ικανότητα επιβίωσης και παραμονής του παθογόνου σε αυτή καθώς έρευνες έδειξαν ότι η κομποστοποιημένη κοπριά των πουλερικών βοηθούσε στη μεγαλύτερη επιβίωση του παθογόνου σε σχέση με την κοπριά των βοοειδών (Islam *et al.*, 2004a; Nyberg *et al.*, 2010). Επιπλέον, κατώτεροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί (ειδικά νηματώδεις σκώληκες) ίσως αποτελούν ένα προσωρινό όχημα για τη μεταφορά του παθογόνου στο χώμα ειδικά στο περιβάλλον πριν τη συγκομιδή αυξάνοντας τον διασκορπισμό και την επιβίωση του. Οι Kenney *et al.*, (2005) έδειξαν ότι οι ορότυποι *S. Newport*, *S. Poona* μπορούν να παραμείνουν στο έντερο των νηματωδών *Caenorhabditis elegans* για τουλάχιστον 2 γενεές.

Σε ότι αφορά το νερό, το μολυσμένο νερό αποτελεί μια πηγή για την είσοδο του παθογόνου στην τροφική αλυσίδα τόσο πριν τη συγκομιδή όσο και κατά τα στάδια μετά τη συγκομιδή αφού χρησιμοποιείται για άρδευση, εφαρμογή φυτοφαρμάκων, καθαρισμό του εξοπλισμού, πλύσιμο της παραγωγής κ.ά (FAO, 2003). Το μολυσμένο νερό άρδευσης αποτελεί ένα σημαντικό κίνδυνο στην εξωτερική και/ή εσωτερική μόλυνση των φυλλωδών λαχανικών (Suslow *et al.*, 2003; Brandl, 2006; Sapers *et al.*, 2006; Doyle and Erickson, 2008; Hanning *et al.*, 2009; Suslow, 2010; Pachepsky *et al.*, 2011; Gil *et al.*, 2013b). Οι διαφορετικοί τρόποι άρδευσης διαφέρουν στην ικανότητα τους να διασπείρουν το παθογόνο. Σύμφωνα με το FAO/WHO (2008), η άρδευση στη βάση του ριζικού συστήματος των λαχανικών μειώνει τον κίνδυνο μεταφοράς του παθογόνου ενώ τα συστήματα άρδευσης υπό μορφή ψεκασμού ή με καταιονισμό οδηγούν στη διασπορά του σε μεγάλες αποστάσεις (Teltsch and Katzenelson, 1978). Σε πειράματα που

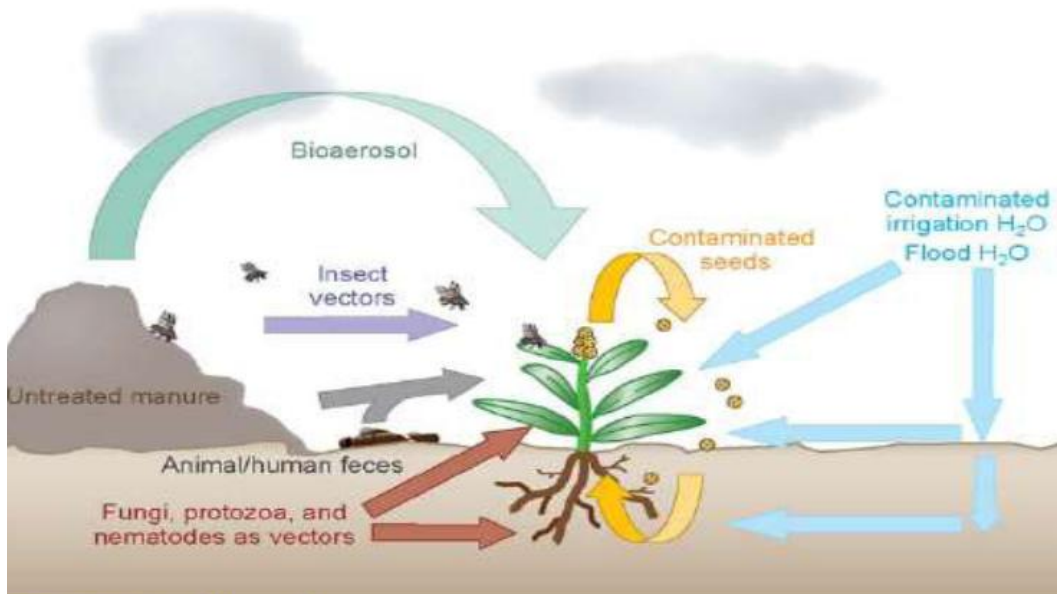
διεξήχθησαν, ο *Salmonella enterica* όταν εμβολιάστηκε στο υδροπονικό θρεπτικό διάλυμα σε καλλιέργεια τομάτας βρέθηκε σε διάφορα μέρη των σποροφύτων όπως στις κοτυληδόνες, στους μίσχους και στα φύλλα. Εναλλακτικά παρατηρήθηκε εσωτερικοποίηση του *Salmonella* σε ώριμες τομάτες μέσα από τα άνθη των φυτών (εναέρια άρδευση). Σε αυτήν την περίπτωση, η εσωτερικοποίηση ανιχνεύθηκε στο 25% των δειγμάτων (Guo *et al.*, 2002). Έρευνες αναφέρουν ότι μετά από μεγάλες βροχοπτώσεις, η χρήση του νερού άρδευσης έχει σαν αποτέλεσμα τη μόλυνση της παραγωγής (Okafo *et al.*, 2003; Castillo *et al.*, 2004; Couley *et al.*, 2007; Ensink *et al.*, 2007). Πρόσφατα κρούσματα που οφείλονται σε μολυσμένο νερό έχουν καταγραφεί σε καλλιέργεια ντομάτας το 2005 καθώς και σε καλλιέργεια μαρουλιού το 2006. Η ποιότητα του νερού που χρησιμοποιείται για την εφαρμογή των φυτοφαρμάκων είναι επίσης σημαντική καθώς τα φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή θεωρούνται ως μια πηγή μικροβιακής επιμόλυνσης (Guan *et al.*, 2001), αφού τα ανθρώπινα παθογόνα μπορούν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν σε διαλύματα τους (Guan *et al.*, 2001; Ng *et al.*, 2005). Μεγαλύτερος κίνδυνος εμφανίζεται όταν η εφαρμογή τους στην επιφάνεια των φυλλωδών λαχανικών γίνεται κοντά στην ώρα της συγκομιδής (Guan *et al.*, 2001; Izumi *et al.*, 2008).

Και κατά την επεξεργασία όμως των λαχανικών, το νερό θεωρείται ως μια πηγή επιμόλυνσης των φυλλωδών λαχανικών καθώς μπορεί να μολυνθεί με οργανισμούς περιττωμάτων και με ανθρώπινα εντερικά παθογόνα (Allende *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2011; Buchholz *et al.*, 2012; Holvoet *et al.*, 2012; Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2013; Holvoet *et al.*, 2014a). Επιπλέον, μόλυνση του προϊόντος προκαλείται και από την ψύξη του με πάγο από μολυσμένο νερό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το κρούσμα που καταγράφηκε στις ΗΠΑ το 1999 από την κατανάλωση μάνγκο το οποίο είχε ψυχθεί με νερό που χρησιμοποιούνταν για την απόθεση μυγών. Η ψύξη υπό κενό, η οποία χρησιμοποιείται για να αποτρέψει τις φυσιολογικές διαταραχές σε φρέσκα προϊόντα και να παρατείνει τη διάρκεια ζωής τους, έχει παρατηρηθεί ότι οδηγεί σε εσωτερικοποίηση του παθογόνου *E. coli* O157: H7 στους ιστούς μαρουλιού (Li *et al.*, 2008.). Μια άλλη περίπτωση επιμόλυνσης των λαχανικών μετά τη συγκομιδή προκύπτει εξαιτίας της μεγάλης θερμοκρασιακής διαφοράς ανάμεσα στα συγκομισθέντα προϊόντα και στο νερό πλυσίματος οδηγώντας έτσι σε είσοδο του νερού στο εσωτερικό των

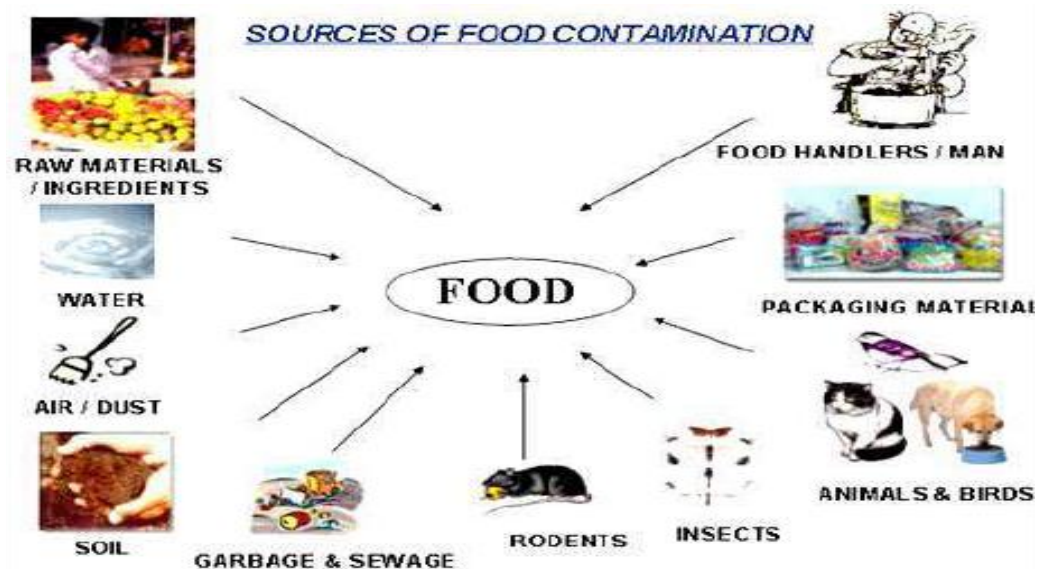
φυτικών ιστών (Buchanan *et al.*, 1999; Penteadó *et al.*, 2004), εξαιτίας της συστολής των αερίων που υπάρχουν στους ενδοκυττάριους χώρους (Bartz and Showalter, 1981). Παρόλα αυτά, σε μια πρόσφατη έρευνα αποδείχτηκε ότι ο μικροοργανισμός ήταν ικανός να εσωτερικοποιείται κατά τη διάρκεια του πλυσίματος σε σπανάκι baby, αν και δεν υπήρχε κανένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα μεταξύ αρνητικής διαφοράς θερμοκρασίας λαχανικού και νερού (Gomez-Lopez *et al.*, 2013). Επιπλέον, η εναλλαγή του ζεστού και κρύου νερού μπορεί να οδηγήσει σε συρρίκνωση των φυτικών κυττάρων, τα οποία διευκολύνουν την είσοδο του παθογόνου στο εσωτερικό τους (Sivapalasingam *et al.*, 2003). Σύμφωνα με έρευνες κατά τον χειρισμό τομάτας, η διαφορά θερμοκρασίας του νερού προκαλούσε συστολή στην ουλή του μίσχου, η οποία επέτρεπε βακτήρια που βρίσκονταν στο νερό να εισέλθουν στους ιστούς των φρούτων (Bartz *et al.*, 1981).

Μια ακόμη πηγή επιμόλυνσης των λαχανικών αποτελεί ο χειρισμός τους από τους εργαζόμενους και η επαφή τους με τον εξοπλισμό κατά τη διάρκεια των σταδίων συγκομιδής και επεξεργασίας τους (Yang *et al.*, 2012). Η κακή υγιεινή των εργαζομένων (μολυσμένα γάντια, λάθος πλύσιμο χεριών κ.λ.π) οδηγεί σε επιμόλυνση του προϊόντος κυρίως κατά τα στάδια επεξεργασίας των λαχανικών (Beuchat and Ryu, 1997; Suslow *et al.*, 2003; Brandl, 2006; James, 2006; Ailes *et al.*, 2008; Caponigro *et al.*, 2010; Gil *et al.*, 2013). Η αναποτελεσματική απολύμανση τους (που οφείλεται κυρίως στο σχηματισμό βιουμενίων και στην εσωτερικοποίηση του παθογόνου) καθιστά δύσκολη την απομάκρυνση του μικροοργανισμού από τις φυτικές επιφάνειες. Επιμόλυνση επιτυγχάνεται τόσο κατά τη χειρωνακτική όσο και κατά τη μηχανική συγκομιδή καθώς στην πρώτη περίπτωση οι εσωτερικοί ιστοί των λαχανικών εκτίθενται στο περιβάλλον του αγρού αυξάνοντας τον κίνδυνο της άμεσης επιμόλυνσης (FAO, 2003, Yang *et al.*, 2012) ενώ στη δεύτερη περίπτωση, ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται μπορεί να σηκώσει από το έδαφος αποθέματα περιττωμάτων (Jay *et al.*, 2007; Lehto *et al.*, 2011) ή να μην έχει καθαριστεί σωστά και να είναι ήδη μολυσμένος. Σε πείραμα το οποίο είχε ως σκοπό την προσομοίωση της εσωτερικοποίησης που προκαλείται από μηχανική βλάβη κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και περιλάμβανε την έγχυση των παθογόνων *E. coli* O157:H7 και *Salmonella* Enteritidis μέσω της φλούδας στο δέρμα των πορτοκαλιών, το ποσοστό της εσωτερικοποίησης έφτασε το 3.0% (Eblen *et al.*, 2004).

Επίσης, και τα κοντέινερ μεταφοράς των λαχανικών φέρουν τον κίνδυνο της επιμόλυνσης της παραγωγής (Prazak *et al.*, 2002; Johnston *et al.*, 2006).



**Εικόνα 1.6:** Πηγές επιμόλυνσης των λαχανικών με *Salmonella* spp. πριν τη συγκομιδή. (Πηγή: Brandl, 2006).





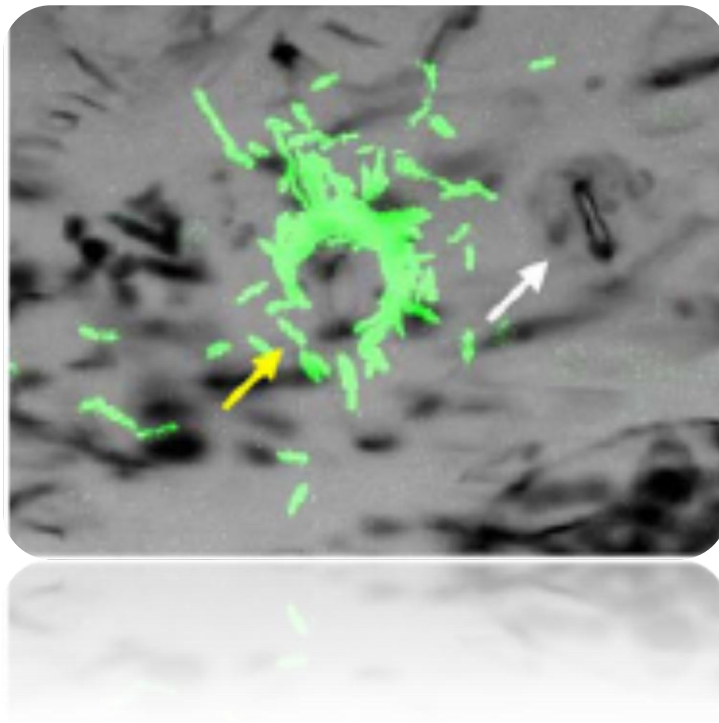
**Εικόνα 1.7:** Πηγές επιμόλυνσης των λαχανικών με *Salmonella* spp. κατά τη συγκομιδή και την επεξεργασία τους. (Πηγή: Brandl, 2006).

### 1.3.1 “Διαδρομές” της μικροβιακής εσωτερικοποίησης

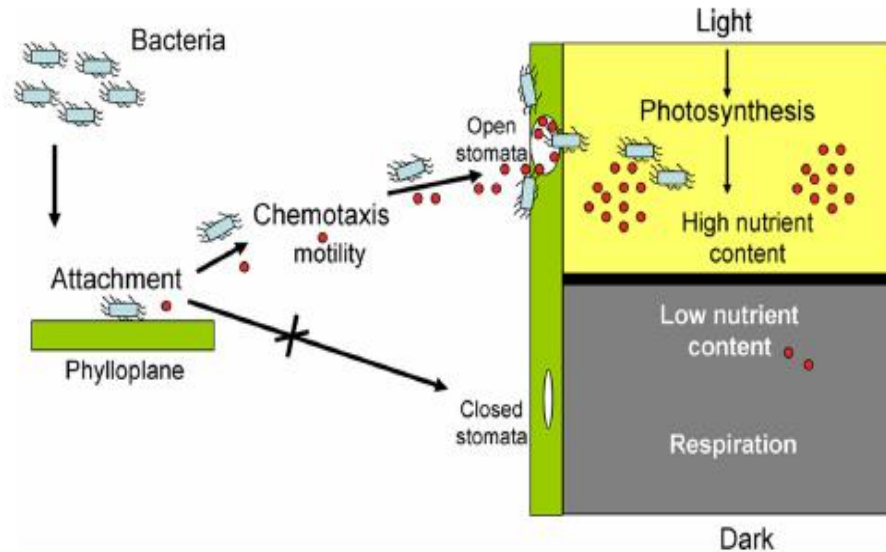
Με βάση πειραματικά δεδομένα και την υπάρχουσα βιβλιογραφία τρεις είναι οι κύριες διαδρομές εισόδου των παθογόνων βακτηρίων στο εσωτερικό των φυτικών ιστών (Εικόνα 1.3.1):

A) Τα βακτήρια είναι ικανά να εισέρχονται στο εσωτερικό των φυτικών ιστών μέσω των στοματίων των φύλλων (Itoh *et al.*, 1998; Dong *et al.* 2003; Duffy *et al.*, 2005; Brandl, 2008; Shaw *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2009; Kroupitski *et al.*, 2009). Σε μελέτη των Shaw *et al.* (2008) έγινε γνωστό ότι το βακτηριακό (τύπου III) σύστημα έκκρισης (TTSS) συνδέεται με την προσκόλληση των βακτηρίων και την κινητικότητα τους στην επιφάνεια του φύλλου. Σε ότι αφορά την είσοδο του παθογόνου μέσω των φυσικών ανοιγμάτων, τα στομάτια των φύλλων έχουν σημαντικό ρόλο στην εσωτερικοποίηση του. Συγκεκριμένα, τα στομάτια αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας των φυτών με αποτέλεσμα μόλις αντιληφθούν την παρουσία του παθογόνου να κλείνουν προκειμένου να αποτρέψουν την είσοδο του στο εσωτερικό τους (Melotto *et al.*, 2006; Underwood *et al.*, 2007) (Εικόνα 1.3.1 A1). Το άνοιγμα και το κλείσιμο των στοματίων επηρεάζεται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως είναι το φως, η υγρασία και η συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> (Schroeder *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2004). Σύμφωνα με τους Kroupitski *et al.* (2009), η εσωτερικοποίηση του παθογόνου στα στομάτια φαίνεται να επηρεάζεται από το φως καθώς τα στομάτια παραμένουν ανοιχτά με αποτέλεσμα ο μικροοργανισμός να μπορεί να εισέλθει εντός τους, σε αντίθεση με το σκοτάδι όπου τα στομάτια κλείνουν και η συγκέντρωση των βακτηρίων γύρω από αυτά μειώνεται αισθητά. Στην ίδια έρευνα, γίνεται αντιληπτός και ο ρόλος της φωτοσύνθεσης, καθώς τεχνητό άνοιγμα των στοματίων στο σκοτάδι δεν έφερε καμία σημαντική επίδραση στην εσωτερικοποίηση του παθογόνου (Turner *et al.*, 1969). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το παθογόνο προσελκύεται από τα θρεπτικά συστατικά (χημειοπροσελκυστικές ουσίες) που παράγονται *de novo* κατά τη φωτοσύνθεση των φυτών από τα φωτοσυνθετικά και τα μεσόφιλα κύτταρα (Kroupitski *et al.*, 2009). Σύμφωνα με δεδομένα, η σουκρόζη (και ίσως η γλυκόζη και η φρουκτόζη) (Mercier and Lindow, 2000) είναι υπεύθυνη για το

φαινόμενο του χημειοτακτισμού καθώς η συγκέντρωση της βρέθηκε να είναι υψηλότερη σε φύλλα που εκτέθηκαν στο φως σε σύγκριση με φύλλα που παρέμειναν στο σκοτάδι. Η σουκρόζη αποτελεί το κύριο φωτοσυνθετικό προϊόν του οποίου η συγκέντρωση κοντά στα κύτταρα «φύλακες» φθάνει έως και τα 150 mM (Lemoine, 2000; Kang *et al.*, 2007). Σε πειράματα που έγιναν προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο ρόλος του χημειοτακτισμού κατά τη φωτοσύνθεση παρατηρήθηκε ότι όταν το παθογόνο εκτιθόταν σε συγκεντρώσεις εξωγενούς γλυκόζης (και των μονοσακχαριτών μεταβολιτών της) σε συγκέντρωση μέχρι και 100 mM η εσωτερικοποίηση του αναστελλόταν, με τη μεγαλύτερη αναστολή να πραγματοποιείται σε συγκεντρώσεις φρουκτόζης (Kroupitski *et al.*, 2009). Επιπλέον, αύξηση της υγρασίας στην επιφάνεια των φύλλων οδηγεί και σε μεγαλύτερο βαθμό εσωτερικοποίησης του παθογόνου (Melotto *et al.*, 2014). Με την ομοεστιακή μικροσκοπία εικόνες που πάρθηκαν σε διάφορα βάθη κάτω από την επιφάνεια των φύλλων μαρουλιού έδειξαν την παρουσία του παθογόνου κάτω από τα στομάτια στον υποστομάτιο χώρο και στην ενδοκυτταρική περιοχή (αποπλάστης) του σπογγώδους παρεγχύματος. Συνήθως, τα βακτήρια παγιδεύονται 20 έως 100μm κάτω από την επιφάνεια των φύλλων (Seo *et al.*, 1999).



**Εικόνα 1.8:** Ικανότητα εσωτερικοποίησης του παθογόνου στα στομάτια των φύλλων. Τα βακτήρια αποικίζουν γύρω από τα ανοικτά στομάτια (κίτρινο βέλος) αλλά όχι γύρω από τα κλειστά στομάτια (λευκό βέλος). (Πηγή: Melotto *et al.*, 2014).

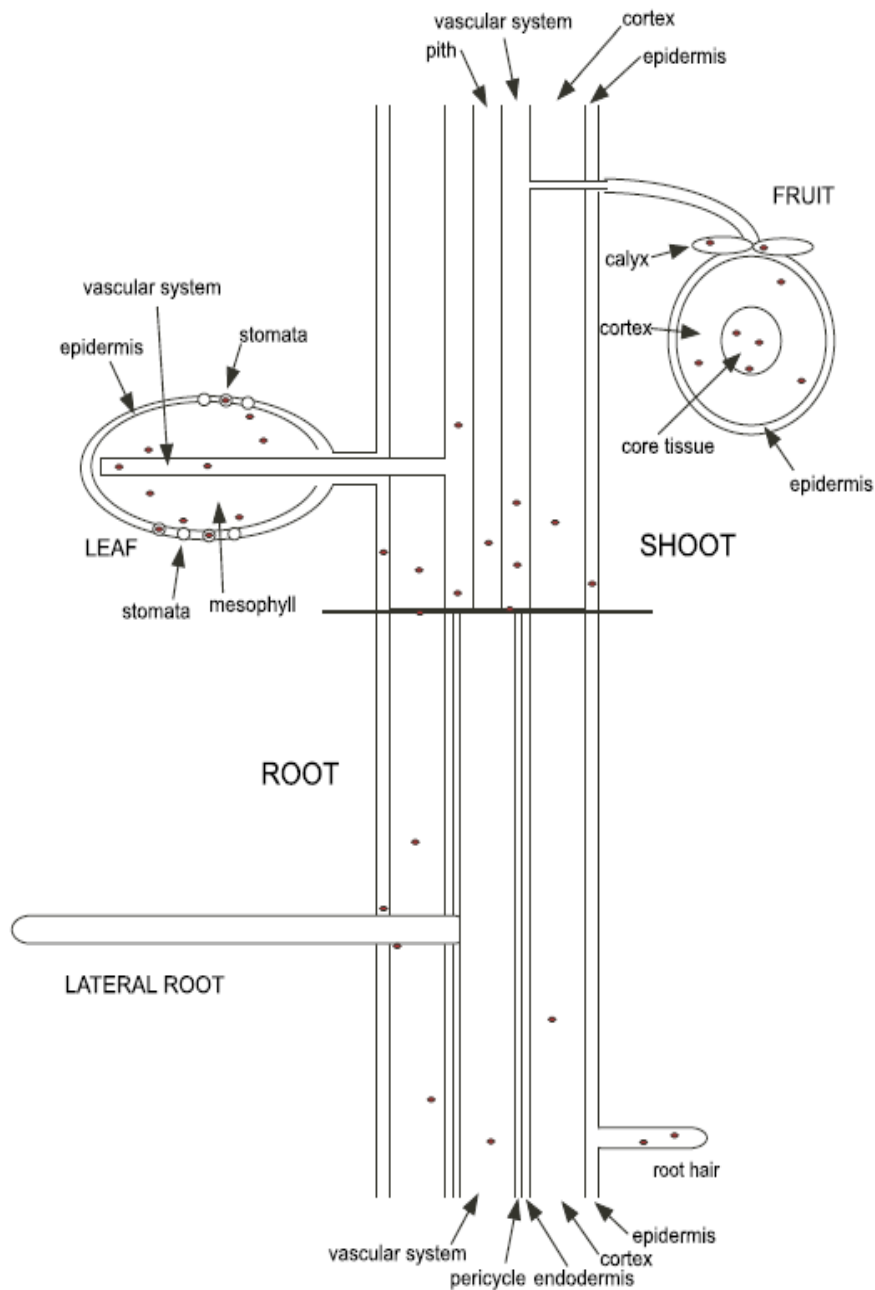


**Εικόνα 1.9 A2:** Εσωτερικοποίηση του *Salmonella* spp. μέσω των στομάτων. Οι κόκκινοι κύκλοι δείχνουν τα υποτιθέμενα χημειοπροσελκυστικά θρεπτικά συστατικά από τα στοματικά κύτταρα «φύλακες» και από τα παρεγχυματικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης. (Πηγή: Kroupitski *et al.*, 2009).

Β) Άλλος ένας τρόπος εισόδου του παθογόνου στα φυτά είναι μέσω βιολογικών ή φυσικών τραυμάτων του φυτού. Οι κατεστραμμένοι ή πληγωμένοι φυτικοί ιστοί είναι πιο εύκολο να εποικιστούν από παθογόνα σε σχέση με τους μη κατεστραμμένους (Han *et al.*, 2000; Brandl and Mandrell, 2002; Seo *et al.*, 2009). Πολλές μελέτες έχουν εκτιμήσει εάν η φυσική ζημιά των παραγόμενων φύλλων ή ριζών επηρεάζει την τύχη των παθογόνων (Park *et al.*, 2012; Hirneisen *et al.*, 2012). Φυσικές ζημιές που προκλήθηκαν σε ρίζες μαρουλιού αύξησαν τον αριθμό των εσωτερικοποιημένων κυττάρων του *Salmonella* Newport στα φύλλα του λαχανικού (Bernstein *et al.*, 2007a) (Εικόνα 1.2.5.3 b).

Γ) Τα βακτήρια είναι επίσης ικανά να εισέρχονται στους εσωτερικούς ιστούς μέσω των σπόρων ή των ριζών του φυτού. Σύμφωνα με έρευνες *Salmonella* spp. έχει απομονωθεί από σπορόφυτα, στελέχη και/ή φύλλα, γεγονός που οφείλεται στην έκθεση των σπόρων σε μολυσμένο νερό (Itoh *et al.*, 1998; Howard and Hutcheston, 2003; Dickinson *et al.*,

2003; Warriner *et al.*, 2003; Jablasone *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2007). Επίσης, έκθεση των ριζών σε νερό μολυσμένο με παθογόνους μικροοργανισμούς (νερό άρδευσης), οδηγεί σε είσοδο τους από αυτές και μετακίνηση τους εντός του φυτού (Guo *et al.*, 2002; Solomon *et al.*, 2002; Bernstein *et al.*, 2007; Kutter *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2007; Lapidot and Yaron, 2009; Mootian *et al.*, 2009; Hintz *et al.*, 2010).



**Εικόνα 1.10:** Σχηματική αναπαράσταση της δομής του φυτού που δείχνει τους ιστούς στους οποίους εσωτερικοποιούνται τα βακτήρια (οβάλ σχήματα). (Πηγή: Deering *et al.*, 2012).

### 1.3.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή εσωτερικοποίηση

Ο βαθμός εσωτερικοποίησης του παθογόνου εξαρτάται από τους παρακάτω παράγοντες: α) συνθήκες καλλιέργειας, β) κλιματικές συνθήκες, γ) βακτηριακό είδος και ορότυπος, δ) ποικιλία του φυτού, ε) αναπτυξιακό στάδιο του φυτού, και στ) ενδογενής χλωρίδα.

Οι τεχνικές παραγωγής, οι συνθήκες ανάπτυξης και η θέση του εδώδιμου τμήματος του φυτού στο έδαφος κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (χώμα, επιφάνεια χώματος, εναέριο τμήμα) σε συνδυασμό με εσωτερικούς και εξωτερικούς παράγοντες είτε κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας είτε κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των φυτών επηρεάζουν τη μικροβιολογική κατάσταση των φυλλωδών λαχανικών τη στιγμή της κατανάλωσης (FAO, 2003). Η μεγάλη ποικιλομορφία των συστημάτων και των συνθηκών καλλιέργειας τους μπορεί να οδηγήσει σε ένα μεγάλο εύρος ακούσιων ή εκούσιων εισροών που αποτελούν εν δυνάμει πηγές κινδύνου για την ασφάλεια των τροφίμων (Suslow *et al.*, 2003). Άλλωστε έρευνες έχουν δείξει ότι οι μικροβιακοί κίνδυνοι καθώς και οι πηγές επιμόλυνσης ποικίλουν από το ένα είδος καλλιέργειας στο άλλο ενώ διαφοροποίηση υπάρχει ακόμη και μέσα στην ίδια την καλλιέργεια (FAO, 2003). Επίσης, ο τρόπος με τον οποίο το παθογόνο εποικίζει το φυτικό ιστό ή εσωτερικοποιείται εντός του, διαφέρει ανάλογα με το είδος του λαχανικού (Mitra *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2012).

Κάθε περιβάλλον ανάπτυξης (που περιλαμβάνει καλλιέργεια στον αγρό ή σε θερμοκήπιο) εμφανίζει ένα συνδυασμό από μοναδικά χαρακτηριστικά που μπορούν να επηρεάσουν την εμφάνιση και την παραμονή του παθογόνου σε φυλλώδη λαχανικά (Strawn *et al.*, 2013a). Πρόσφατα οι Strawn *et al.*, (2013) προσδιόρισαν τις ιδιότητες του χώματος και τα τοπογραφικά χαρακτηριστικά που ευνοούν την ανάπτυξη του παθογόνου. Επιφάνειες με συσσωματώματα, εδάφη με υγρασία καθώς και βοσκοτόπια ήταν πιο

επίφοβα στο να είναι επιμολυσμένα με μικροοργανισμούς (Chandler and Craven, 1980; Holley *et al.*, 2006). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι εάν η καλλιέργεια βρισκόταν κοντά σε μια φάρμα εκτροφής ζώων, υπήρχε πιο έντονα το ενδεχόμενο το προϊόν να επιμολυνθεί, άμεσα ή έμμεσα από ζώα, εκροές, βιοαεροζόλ, σκόνη, πουλιά, τρωκτικά ή μύγες (Davies and Wray, 1996; Brandl, 2006; FAO, 2003; Varma *et al.*, 2003; Baertsch *et al.*, 2007; Gelting *et al.*, 2011).

Οι κλιματικές συνθήκες αποτελούν άλλον ένα σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό της πηγές επιμόλυνσης καθώς και τα "μονοπάτια" που ακολουθούν οι παθογόνοι μικροοργανισμοί στα φυλλώδη λαχανικά πριν τη συγκομιδή τους (FAO, 2003; Solomon *et al.*, 2007; Tirando *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013). Συγκεκριμένα, οι ακραίες καιρικές συνθήκες όπως η εναλλαγή πλημμυρών και ξηρασίας αυξάνουν τον κίνδυνο επιμόλυνσης των λαχανικών (Rose *et al.*, 2001; Tirando *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013), με κοπριά και σωματίδια χόματος που προέρχονται από την κατακρήμνιση του εδάφους (Franz *et al.*, 2005; Girardin *et al.*, 2005; Cevallos-Cevallos *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013). Αυτές οι απότομες εναλλαγές, οδηγούν επίσης, σε υπερβολική συγκέντρωση του νερού στη ρίζα των φυτών μπλοκάροντας το οξυγόνο και συναθροίζοντας διάφορα ορυκτά γύρω από τη ρίζα προκαλώντας ενίοτε ζημιά των ριζικών τμημάτων (Drew, 1997). Οι πλημμύρες αυξάνουν τη διαπερατότητα των μεμβρανών της ρίζας με αποτέλεσμα όλο και περισσότερες θρεπτικές ουσίες να διαρρέουν στη ριζόσφαιρα και επομένως να αυξάνεται η ανάπτυξη των παθογόνων που προκαλούν αποσύνθεση των ριζών και επηρεάζουν τις φυσιολογικές λειτουργίες τους (Kirkpatrick, Rupe, and Rothrock, 2006). Έρευνες που έγιναν σε μαρούλι που επιμολύνθηκε με *Salmonella* spp. επιβεβαίωσαν ότι η επιμόλυνση μέσω των περιττωμάτων αυξάνεται μετά από πλημμύρες (Casteel *et al.*, 2006; Castro-Ibanez *et al.*, 2013). Επιπλέον, η αύξηση της θερμοκρασίας, ως ένας άλλος σημαντικός παράγοντας, οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού της μικροβιακής ανάπτυξης και αυτό ίσως επηρεάζει τον πληθυσμό των εντόμων και των παρασίτων που βρίσκονται στα αγροκτήματα και είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά των ανθρώπινων παθογόνων στα φυλλώδη λαχανικά. Μεγαλύτερος αριθμός εσωτερικοποιημένων κυττάρων εμφανίζεται κυρίως τους θερινούς μήνες σε υγρό και θερμό περιβάλλον γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στη διάρκεια της ημέρας, στην ένταση του φωτός, στη θερμοκρασία και στην υγρασία (Goldberg *et al.*

2011; Natvig *et al.*, 2002). Σε μελέτη των Dreux *et al.*, (2007), αποδείχθηκε ότι η σχετική υγρασία (RH) του περιβάλλοντος παίζει σημαντικό ρόλο στην εσωτερικοποίηση του μικροοργανισμού. Σύμφωνα με τους Cooley *et al.*, (2003) βρέθηκε ότι σε 100% σχετική υγρασία και απουσία ανταγωνισμού, το *E. coli* O157:H7 και ο *Salmonella enterica* εντοπίστηκαν σε συγκέντρωση  $10^7$  CFU/g στο φυτικό ιστό της φυλλόσφαιρας του *Arabidopsis thaliana*. Συγκεκριμένα, η αύξηση της υγρασίας επηρεάζει το άνοιγμα και το κλείσιμο των στοματιών κατά τη φωτοσύνθεση καθώς και το ποσοστό των χημειοπροσελκυστικών ουσιών με αποτέλεσμα την αύξηση των εσωτερικοποιημένων κυττάρων του παθογόνου (Goldberg *et al.*, 2011). Επομένως, όπως έχει αποδειχθεί σε αρκετές μελέτες οι παράγοντες, θερμοκρασία και βροχόπτωση, επηρεάζουν θετικά τον πληθυσμό του παθογόνου μικροοργανισμού (Semenza and Menne, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2012). Για παράδειγμα, στην περίπτωση του κόλιανδρου και του μαϊντανού, ο αριθμός των κυττάρων του παθογόνου ήταν υψηλότερος το φθινόπωρο σε σχέση με την άνοιξη ή το χειμώνα, και υψηλότερος την άνοιξη σε σχέση με τον χειμώνα (Ailes *et al.*, 2008). Επίσης, ο παθογόνος μικροοργανισμός ανιχνεύθηκε κατά τη συγκομιδή σε επιμολυσμένους αγρούς που προσομοίαζαν υγρό και ζεστό περιβάλλον και όχι σε αγρούς που προσομοίαζαν ένα ξηρότερο και ψυχρότερο περιβάλλον (Natvig *et al.*, 2009).

Πολλές μελέτες αναφέρονται και στο αντίκτυπο του τύπου καλλιέργειας και των ποικιλιών που χρησιμοποιούνται στον εποικισμό των παθογόνων καθώς σε διαφορετικές ποικιλίες παρατηρήθηκε και διαφορετικός βαθμός επιμόλυνσης με *Salmonella* spp. (Barak *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2012). Χαρακτηριστικό παράδειγμα, η έρευνα των Klercks *et al.* (2004), που έδειξε διαφορετική αλληλεπίδραση μεταξύ των εμπορικά διαθέσιμων ποικιλιών μαρουλιού και της επιβίωσης των οροτύπων *S. enterica*, καθώς οι ορότυποι *S. enterica* ήταν ικανοί να αποικίζουν το μαρούλι επιφυτικά αλλά μόνο η *S. enterica* serovar Dublin ήταν επίσης ικανή να εποικίζει τα φυτά και ενδοφυτικά. Οι Hutchison *et al.* (2008) ανέφεραν επίσης, ότι ο αριθμός του πληθυσμού *Salmonella* που βρέθηκε στο μαρούλι ήταν αρκετά υψηλότερος από αυτόν που βρέθηκε στο σπανάκι. Ο ρόλος του είδους του λαχανικού στην εσωτερικοποίηση φαίνεται και στα αποτελέσματα των Kroupitski *et al.*, (2009), όπου στο μαρούλι και στη ρόκα παρατηρήθηκε μεγαλύτερος εσωτερικοποιημένος πληθυσμός του παθογόνου μικροοργανισμού

*Salmonella* spp. σε σχέση με το βασιλικό, γεγονός που πιθανώς αποδίδεται στις αντιμικροβιακές ουσίες που περιέχει ο βασιλικός (Hammer *et al.*, 1999).

Σε ότι αφορά το ρόλο του ορότυπου στην προσκόλληση και/ή εσωτερικοποίηση του παθογόνου, οι Berger *et al.* (2009) ανέφεραν ότι οι ορότυποι *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* και *S. Seftenberg* προσκολλώνται αποτελεσματικότερα σε φυλλώδη λαχανικά σε σχέση με άλλους ορότυπους (*S. Arizona*, *S. Heidelberg*, *S. Agona*). Επιπλέον, οι μηχανισμοί προσκόλλησης διαφέρουν μεταξύ των ορότυπων (Barak *et al.*, 2005; Gibson *et al.*, 2006; Barak *et al.*, 2007; Lapidot and Yaron, 2009) και ο ρόλος των μαστιγίων στην προσκόλληση του παθογόνου μικροοργανισμού στα φύλλα δείχνει ότι διαφορετικοί ορότυποι χρησιμοποιούν ειδικούς μηχανισμούς για να προσκολληθούν σε διαφορετικά λαχανικά όπως μαρούλι, σπανάκι, ρόκα (Berger *et al.*, 2009).

Η ηλικία των φύλλων, αποτελεί έναν ακόμη σημαντικό παράγοντα για την ανάπτυξη και την επιβίωση των βακτηρίων και φαίνεται να επηρεάζει τον εποικισμό των παθογόνων στο λαχανικό τόσο πριν όσο και μετά τη συγκομιδή (Park *et al.*, 2012). Συγκεκριμένα, οι Bernstein *et al.* (2007b) έδειξαν ότι τα ποσοστά επιμόλυνσης στα ώριμα φύλλα των λαχανικών ήταν αρκετά υψηλότερα σε σχέση με αυτά στα νεαρά φύλλα. Σε σχέση όμως με τα ενδιάμεσης ωριμότητας φύλλα, τα νεαρότερα φύλλα φέρουν υψηλότερους πληθυσμούς σύμφωνα με τη μελέτη των Brandl and Amundson (2008) που έγινε σε μαρούλι και έδειξε ότι τα νεαρά φύλλα ήταν 2,9 και 1,5 φορές πλουσιότερα σε ολικό άζωτο και άνθρακα, αντιστοίχως, από το έκκριμα από τα μεσαία φύλλα (μεγάλα φύλλα). Η βακτηριακή εποίκιση στη φυλλόσφαιρα των λαχανικών ποικίλει στα διάφορα φυτά και επηρεάζεται επίσης και από άλλες ιδιότητες της επιφάνειας του φύλλου, συμπεριλαμβανομένου της μορφολογίας (σύνθεση κηρωδών επιφανειών, τραχύτητα, πάχος μεσόφυλλου), των χημικών συστατικών (παρεμποδιστικές φαινόλες) και των μεταβολικών δραστηριοτήτων του (Beuchat, 2002; Lindow and Brandl, 2003; Yadav *et al.*, 2005; Heaton and Jones, 2008).

Κάτι άλλο το οποίο αξίζει να αναφερθεί είναι ότι παρά την παρουσία των παθογόνων στα λαχανικά η ικανότητα των μικροοργανισμών αυτών να επιβιώνουν, να αναπτύσσονται και να προκαλούν ασθένεια εξαρτάται και από την ενδογενή μικροχλωρίδα των λαχανικών και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ενδογενούς

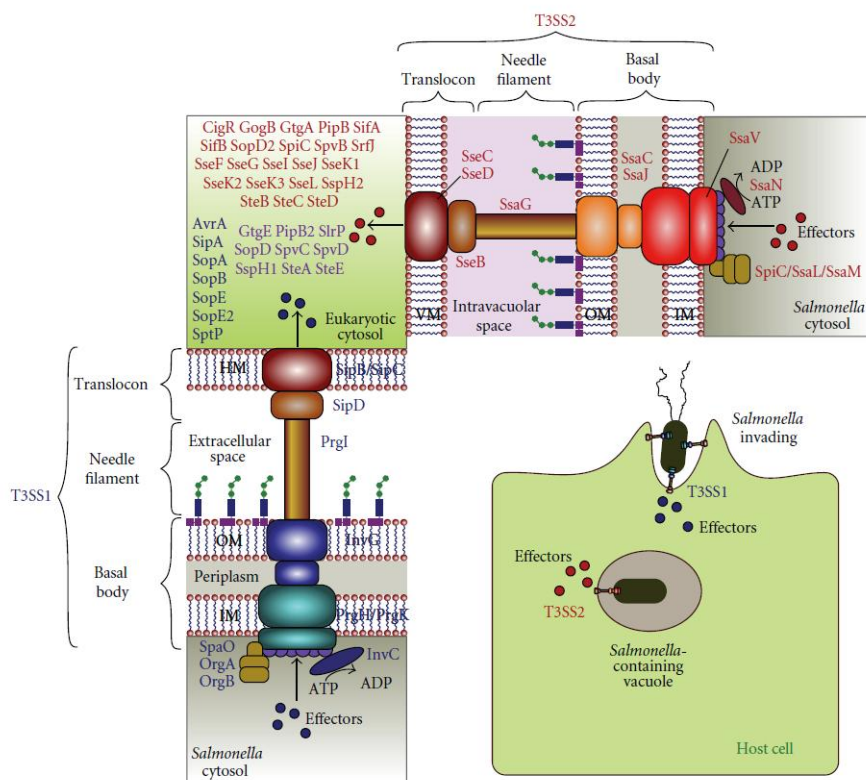


μικροχλωρίδας και του παθογόνου (Bradl, 2006) καθώς και τις αποκρίσεις τους σε δυσμενείς συνθήκες κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και αποθήκευσης. Όπως είναι ήδη γνωστό, η επιφάνεια των φυλλωδών λαχανικών δεν αποτελεί ιδανικό περιβάλλον για την επιβίωση των εντερικών παθογόνων καθώς εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία και διαφορές-διακυμάνσεις θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας (παρουσία ή απουσία βροχής / άρδευσης). Συγκεκριμένα, η ενδογενής μικροχλωρίδα (ιδιαίτερα τα οξυγαλακτικά βακτήρια) επηρεάζει την εποίκιση και την ανάπτυξη των παθογόνων βακτηρίων στην επιφάνεια των λαχανικών (Vescovo *et al.*, 1995; Carlin *et al.*, 1996; Liao and Fetti, 2001; Parish *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2006), καθώς ο ανταγωνισμός για χώρο και θρεπτικά συστατικά σε συνδυασμό με τις ανταγωνιστικές ουσίες επιδρούν αρνητικά στην επιβίωση του παθογόνου παθογόνου (Liao and Fetti, 2001; Parish *et al.*, 2003). Οι Lima *et al.*, (2013) ανέφεραν ότι προσκόλληση των παθογόνων σε μαρούλι που καλλιεργήθηκε με συμβατικό τρόπο ήταν αρκετή χαμηλή λόγω του υψηλού αριθμού των γαλακτικών βακτηρίων σε συνδυασμό με τον χαμηλό βαθμό τραχύτητας και υδροφοβικότητας των φύλλων. Η κυρίαρχη ομάδα μικροοργανισμών της επιφάνειας των φύλλων είναι τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Lund, 1992) και συγκεκριμένα βακτήρια των οικογενειών *Enterobacteriaceae* και *Pseudomonadaceae*, ενώ ακολουθούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια, οι ζύμες και οι μύκητες (Brocklehurst *et al.*, 1987; Nguyen and Carlin, 1994; Sagoo *et al.*, 2003). Οι πληθυσμοί των αερόβιων βακτηρίων στα φυλλώδη λαχανικά μπορεί να κυμαίνονται ακόμη και πάνω από  $10^5$  CFU / g ιστού φύλλων (Mersier and Lindow, 2000; Aguscavage *et al.*, 2006). Τα μικρόβια αυτά δημιουργούν στα φύλλα των φυτών βιουμένια (biofilms), τα οποία τους παρέχουν προστασία έναντι των δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών. Τα βιουμένια που δημιουργούνται στα φύλλα μπορούν να επηρεάσουν την προσκόλληση, την ανάπτυξη και την επιβίωση των εντερικών παθογόνων στην επιφάνεια του φύλλου. Επιπλέον, φυτοπαθογόνα βακτήρια όπως η *Erwinia* μπορούν να δράσουν συνεργιστικά με τα εντερικά παθογόνα, καθώς υποβαθμίζουν τον φυτικό ιστό, παρέχοντας με αυτόν τον τρόπο στα εντερικά παθογόνα θρεπτικές ουσίες για την ανάπτυξη τους (Agtios, 1997). Συνήθως, η ενδογενής μικροχλωρίδα εγκαθίσταται κατά προτίμηση στη βάση των τριχιδίων, την περιφέρεια των στομάτων και κατά μήκος των νεύρων των φύλλων (Beattie and Lindow, 1999; Leveau and Lindow, 2001) ενώ οι παθογόνοι

μικροοργανισμοί εντοπίζονται κοντά στα νεύρα των φύλλων (Cooley *et al.*, 2003). Ο λόγος μπορεί να σχετίζεται με τη μεγαλύτερη υγρασία της περιοχής και την αυξημένη διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων και νερού (Brandl and Mandrell, 2002).

#### **1.4 Εκκριτικά συστήματα που αφορούν την εσωτερικοποίηση του παθογόνου και ενεργοποίηση της άμυνας των φυτών**

Το παθογόνο *Salmonella* spp. (όπως και πολλά άλλα Gram-αρνητικά βακτήρια) προκειμένου να εισέλθουν στο εσωτερικό των φυτών χρησιμοποιούν εκκριτικά συστήματα. Συγκεκριμένα, το εκκριτικό σύστημα το οποίο χρησιμοποιεί η *Salmonella* είναι το T3SS (Rahme *et al.*, 1995; Staskawicz *et al.*, 2001), το οποίο είναι σύστημα μεταφοράς ενός σταδίου, όπου η μεταφορά των πρωτεϊνών διενεργείται απευθείας μέσω μεμβρανών καθώς αυτές εξέρχονται κατευθείαν στο κυτόπλασμα. Στο σύστημα αυτό ανήκουν και οι ζώνες παθογένειας SPI-1(*hilA*, *prgH*, *invA*) και SPI-2 (*ssrB*, *avrA*), όπου τα γονίδια τους είναι απαραίτητα για την προσβολή των επιθηλιακών κυττάρων, καθώς και για την επιβίωση και την εξάπλωση του παθογόνου στα κύτταρα του ξενιστή (Marcus, 2000; Shirron and Yaron, 2011). Πιο συγκεκριμένα, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι μεταλλαγμένα στελέχη *S. Typhimurium*, στα οποία απουσίαζαν γονίδια είτε του SPI-1(*invA*- και *prgH*-) είτε του SPI-2 (*ssaF*- και *ssaV*-) αδυνατούσαν να καταστείλουν την αντίδραση υπερευαισθησίας στο φυτό *Arabidopsis thaliana* και εμφάνιζαν μειωμένο ρυθμό εξάπλωσης στο φυτό (Schicora *et al.*, 2011, 2012). Το σύστημα αυτό αναφέρθηκε και στην παράγραφο 1.2.4 καθώς αφορά τον τρόπο επιμόλυνσης όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων από το παθογόνο.



**Εικόνα 1.11:** Σχηματική αναπαράσταση των εκκριτικών συστημάτων T3SS1 και T3SS2 του *Salmonella*. (Πηγή: [www.hindawi.com](http://www.hindawi.com))

Παρόλα αυτά, τα φυτά ξενιστές έχουν αναπτύξει ένα σύστημα υποδοχέων το οποίο έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει κοινά συστατικά της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου και να ενεργοποιεί ποικίλες αποκρίσεις οι οποίες έχουν την ικανότητα να περιορίζουν την ανάπτυξη και την εξάπλωση του παθογόνου (Nurnberger *et al.*, 2004; Ausubel, 2005; Jones and Dagle, 2006) στο εσωτερικό των φυτικών ιστών. Συγκεκριμένα, τα φυτά είναι σε θέση να ξεχωρίζουν συγκεκριμένες ουσίες των βακτηρίων, οι οποίες είναι συνήθως συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων καθώς και επιφανειακές δομές όπως φλαγγελίνη, πεπτιδογλυκάνες, λιποπολυσακχαρίτες κ.λ.π (pathogen-associated molecular patterns –PAMPs) μέσω ενός συστήματος εξωκυττάρων υποδοχέων αναγνώρισης (pattern-recognitionreceptors- PRRs) (Asai *et al.*, 2002; Zeidler *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2004; Iniguez *et al.*, 2005). Οι υποδοχείς αυτοί στέλνουν ενδοκυτταρικά σήματα ενεργοποιώντας έτσι την άμυνα του φυτού για να σταματήσει την εισβολή του παθογόνου. Οι Zipfel and Robatzek (2010) αναφέρουν ότι οι πρώτες αποκρίσεις των

φυτών μετά την αναγνώριση του παθογόνου διαδραματίζονται εντός μερικών δευτερολέπτων έως λεπτών περιλαμβάνοντας ροή ιόντων, εξωκυτταρική αλκαλοποίηση και οξειδωτική <<έκρηξη>>. Οι ενδιάμεσες αποκρίσεις συμβαίνουν εντός μερικών λεπτών έως ωρών και περιλαμβάνουν κλείσιμο των στοματίων, παραγωγή αιθυλενίου, ενεργοποίηση της πρωτεινικής κινάσης (MAPK) και μεταγραφικό επαναπρογραμματισμό. Οι τελευταίες αποκρίσεις λαμβάνουν χώρα μέρες έως ώρες αργότερα, και περιλαμβάνουν εναπόθεση της καλλόζης, συσσώρευση σαλυκιλικού οξέος και μεταγραφή των γονιδίων άμυνας (Melotto *et al.*, 2014). Σε έρευνα που διεξήχθη στο φυτό *Arabidopsis thaliana* το γιασεμινικό οξύ και το αιθυλένιο ήταν οι κύριοι μηχανισμοί άμυνας εναντίον της διείσδυσης *S. Typhimurium*. Παρόλα αυτά ο παθογόνος μικροοργανισμός κατάφερε να εισέλθει στο εσωτερικό των φυτικών ιστών, γεγονός το οποίο ενδεχομένως να οφείλεται είτε στο ότι τα αντιγόνα του παθογόνου δεν αναγνωρίστηκαν σωστά από τα στομάτια «φύλακες» είτε στο ότι με κάποιο τρόπο το παθογόνο ανέστειλε το κλείσιμο των στοματίων.

### **1.5 Αυξημένη επικινδυνότητα της εσωτερικοποίησης λόγω αναποτελεσματικότητας των απολυμαντικών και νέοι τρόποι αντιμετώπισης της**

Σε επίπεδο βιομηχανικής παραγωγής λαχανικών, το πλύσιμο είναι η μόνη μέθοδος που χρησιμοποιείται με σκοπό την μείωση του μικροβιακού φορτίου στα φυλλώδη λαχανικά. Η μέθοδος περιλαμβάνει προσθήκη χλωρίου στο νερό της πλύσεως με τελική συγκέντρωση 50-200 ppm (Beuchat *et al.*, 1998). Παρόλα αυτά η μέθοδος αυτή κρίνεται ως αναποτελεσματική καθώς οδηγεί μόνο σε μείωση του 90-99% των μικροοργανισμών (1-2 log μείωση), η οποία έχει επιβεβαιωθεί από αρκετές εργαστηριακές μελέτες (Lang *et al.*, 2004; Fytros *et al.*, 2011). Ο λόγος έλλειψης αποτελεσματικότητας των απολυμαντικών ενδεχομένως να οφείλεται στην ισχυρή προσκόλληση του παθογόνου στην επιφάνεια του φυτού, στο σχηματισμό βιομενίων καθώς και στην ικανότητα του να εσωτερικοποιείται εντός των φυτικών ιστών (Burnett and Beuchat, 2000; Sapers, 2001). Η αναποτελεσματικότητα του συμβατικού πλυσίματος οδήγησε στην ανακάλυψη νέων μεθόδων με σκοπό την απενεργοποίηση των εσωτερικοποιημένων παθογόνων και τη διατήρηση της φρεσκάδας των προϊόντων. Η

ακτινοβόληση τροφίμων είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές εργαστηριακές μελέτες. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συχνότερα είναι:

- Η ακτινοβολία  $\gamma$  (ιονίζουσα ακτινοβολία). Εξασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων, βελτίωση της ποιότητας τους και αύξηση του χρόνου ζωής τους (Arvanitoyannis *et al.*, 2008). Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε, εμβολιασμένα με *E. coli* φύλλα μαρουλιού ακτινοβολήθηκαν με 0.25, 0.50, 0.75, και 1.0 kGy ακτινών  $\gamma$ , σε θερμοκρασία 15 °C και παρατηρήθηκε έως 4 logCFU/g μείωση του εσωτερικοποιημένου παθογόνου (Gomes *et al.*, 2009). Ακόμα κι αν η χρήση ιονίζουσας-ακτινοβολίας στα τρόφιμα επιβεβαιώνεται ότι είναι ασφαλής, το καταναλωτικό κοινό παραμένει επιφυλακτικό (Mahapatra *et al.*, 2005).
- Η ακτινοβολία UV (μη ιονίζουσα ακτινοβολία). Χωρίζεται σε τρεις τύπους ανάλογα με το μήκος κύματος : (1) UV-A (320-400 nm), (2) UV-B (280-320 nm), (3) UV-C (200-280 nm). Το μήκος κύματος της υπεριώδους ακτινοβολίας μεταξύ 220 έως 300 nm έχει αποδειχθεί ότι έχει μικροβιοκτόνο δράση έναντι των περισσοτέρων μικροοργανισμών όπως τα βακτηρίδια, οι μύκητες και τα πρωτόζωα. Η μέγιστη βακτηριοκτόνος δράση έχει ανιχνευθεί στην περιοχή UV-C, μεταξύ των 250 και 270 nm. Σύμφωνα με τους Guerrero and Barbarosa (2004), η UV-C ακτινοβολία με μήκος κύματος 254 nm έχει χρησιμοποιηθεί για την απολύμανση του νερού, των επιφανειών και των τροφίμων στο παρελθόν και έχει παρατηρηθεί ότι δεν παράγει καρκινογόνα υποπροϊόντα. Επίσης, σε μελέτη των Hajok *et al.* (2008) παρατηρήθηκε ότι ο συνδυασμός της χρήσης υπεριώδους ακτινοβολίας (37.8 mJ/cm<sup>2</sup>) και υπεροξειδίου του υδρογόνου (1.5% w/L, 60s) μπορεί να μειώσει τον *Salmonella* Montevideo P2 στην επιφάνεια του μαρουλιού κατά 4.12 log CFU/g, επιτυγχάνοντας μείωση 2.84 log CFU/g των εσωτερικοποιημένων κυττάρων στους 50 °C. Γενικότερα, συνδυασμός της UV-C με άλλες χημικές μεθόδους απολύμανσης μπορεί να λειτουργήσει συνεργιστικά και να επιφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα.

## 1.6 Καταπόνηση του παθογόνου μικροοργανισμού (stress)

Όπως είναι γνωστό, κάτω από άριστες συνθήκες ανάπτυξης, όπως άφθονα θρεπτικά συστατικά, άριστη (optimum) θερμοκρασία ανάπτυξης, pH, επίπεδα οξυγόνου, ενεργότητα νερού κ.ά., οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται με το μέγιστο ρυθμό ανάπτυξής τους. Όταν οι συνθήκες αυτές δεν είναι ευνοϊκές για το μικροοργανισμό, τα μικροβιακά κύτταρα υποβάλλονται σε stress (Bearson *et al.*, 1998). Τα τροφιμογενή παθογόνα μπορεί να βρεθούν σε δυσμενείς για την επιβίωσή τους συνθήκες, σχεδόν σε κάθε περιβάλλον διαβίωσής τους: φυσικό (π.χ. έδαφος, συστήματα νερού), χώρος επεξεργασίας (π.χ. σφαγεία, εργοστάσια επεξεργασίας τροφίμων) και οικιακό (π.χ. ζώα, άνθρωποι) (Winfield and Groisman, 2003). Οι αποκρίσεις τους σε αυτές τις συνθήκες επηρεάζουν όχι μόνο την ανάπτυξη και την επιβίωσή τους, αλλά την αντοχή τους σε αντιμικροβιακές ουσίες (Clements *et al.*, 2001; Altier, 2005; Dodd *et al.*, 2007; McMahon *et al.*, 2007). Προκειμένου να επιβιώσουν στις αιφνίδιες, πιθανά θανατηφόρες, αλλαγές του μικροπεριβάλλοντος, τα βακτήρια είναι ικανά να αναπτύξουν μηχανισμούς που θα τα βοηθήσουν να επιβιώσουν σε ένα ευρύ φάσμα στρεσογόνων παραγόντων-συνθηκών.

### 1.6.1 Όξινη καταπόνηση και επιβίωση του μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε αυτές τις συνθήκες

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί έρχονται αντιμέτωποι με διάφορα οργανικά και ανόργανα οξέα στα τρόφιμα ή στο γαστρεντερικό σύστημα και τα κύτταρα του ξενιστή. Σύμφωνα με μελέτη των Mikkelsen *et al.*, (2004), το όξινο pH του στομάχου συμπεριλαμβάνεται στις πρώτες γραμμές άμυνας του οργανισμού ενάντια στην εισβολή παθογόνων βακτηρίων. Το γαστρικό υγρό κατά προσέγγιση έχει εύρος τιμών pH που κυμαίνεται από 1.5 έως 3.0 καθώς η συγκέντρωση του HCl ανέρχεται σε 150-160 mEq / L. Τόσο λοιπόν τα οξέα του στομάχου όσο και εκείνα που χρησιμοποιούνται κατά την επεξεργασία και συντήρηση των τροφίμων έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη και την επιβίωση των μικροοργανισμών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα περισσότερα τροφιμογενή παθογόνα (ιδιαίτερα τα εντερικά) και τα βακτήρια που

προκαλούν αλλοιώσεις (κυρίως τα Gram-αρνητικά) είναι ευαίσθητα σε χαμηλό pH . Συγκεκριμένα, η όξινη αυτή καταπόνηση προκαλεί διάφορες μεταβολές στη δομή και στις λειτουργίες των κυττάρων όπως για παράδειγμα αλλαγή στη σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης, αύξηση της ροής των πρωτονίων και του καταβολισμού των αμινοξέων, αλλαγές υδρόλυση των νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) κ.α.

Ωστόσο, η αυξημένη οξεοανθεκτικότητα του *Salmonella* spp. έχει αποδειχθεί σε πληθώρα μελετών (Bacon *et al.*, 2003; Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2009b, 2010). Η ομοιόσταση του εσωτερικού pH του κυττάρου του μικροοργανισμού *Salmonella* spp. όταν αυτός εκτίθεται σε ακραία όξινες τιμές pH, διατηρείται όταν ο μικροοργανισμός έχει προηγουμένως υποστεί ήπια όξινη καταπόνηση (Yousef and Courtney, 2003). Αυτό επιτρέπει τη σύνθεση εκ μέρους του βακτηριακού κυττάρου πρωτεϊνών όξινης καταπόνησης (acid stress proteins) όταν βρεθεί αργότερα σε πολύ χαμηλές τιμές pH περιβάλλοντος, κάτι το οποίο θα ήταν ανέφικτο σε κύτταρα που δεν θα είχαν υποστεί αυτή την αρχική προσαρμογή και θα εκτίθονταν απευθείας σε ακραία όξινες τιμές pH (Beales *et al.*, 2004). Επιπλέον, η αντίδραση σε όξινη καταπόνηση διαφέρει μεταξύ των κυττάρων που βρίσκονται στην εκθετική και στην στατική φάση αλλά και μεταξύ των διαφόρων ειδών βακτηρίων.

Το σύστημα που συμβάλλει στη διατήρηση της ανθεκτικότητας του μικροοργανισμού σε συνθήκες όξινης καταπόνησης είναι το σύστημα αποκαρβοξυλάσης της λυσίνης (lysine decarboxylase - CadA) το οποίο λειτουργεί σε συνδυασμό με ένα μεταφορέα λυσίνης:καδαβερίνης (CadB) (Park *et al.*, 1996; Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2010). Ο μικροοργανισμός *Salmonella* spp. μπορεί να επιβιώσει έναντι πολλών διαφορετικών συνθηκών όξινης καταπόνησης, αφού η επιβίωσή του εξαρτάται από το ποιά αμινοξέα είναι διαθέσιμα στο περιβάλλον ανάπτυξης (λυσίνη, ορνιθίνη, αργινίνη) οπότε και θέτει σε «λειτουργία» το αντίστοιχο σύστημα επαγωγής οξεοανθεκτικότητας. Έχουν αναγνωριστεί τρεις ρυθμιστικές πρωτεΐνες , οι RpoS, Fur και PhoP, που ελέγχουν διάφορα συστήματα ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση και προκαλούν την έκφραση μιας ομάδας πρωτεϊνών σε αυτές τις συνθήκες (Lowen *et al.*, 1998). Συγκεκριμένα, ο παράγοντας σίγμα, σS, που κωδικοποιείται από τις RpoS ρυθμίζει ένα μέρος της οξεοανθεκτικότητας του *Salmonella* spp. και αποτελεί επίσης ένα κρίσιμο

ρυθμιστή της φυσιολογίας του κυττάρου κατά την στατική φάση ανάπτυξης ενώ έχει αποδειχτεί η χρησιμότητά του και κατά την εκθετική φάση (Lee *et al.*, 1994, 1995; Hengge-Aronis, 1996). Μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν τις ανωτέρω ρυθμιστικές πρωτεΐνες οδηγούν σε πιθανή μείωση της ανθεκτικότητας του κυττάρου σε συνθήκες όξινης καταπόνησης.





## 1.7. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Τα τελευταία χρόνια, η ραγδαία αύξηση της ζήτησης των έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων στα οποία εντάσσονται τα λαχανικά (Falomir *et al.*, 2010), έχουν καθιερώσει τον *Salmonella* spp. ως κύριο υπαίτιο για την εκδήλωση μιας πληθώρας τροφιμογενών λοιμώξεων (FAO/WHO, 2013). Αυτό οφείλεται ενδεχομένως στη χαμηλή μολυσματική δόση και τη μεγάλη συχνότητα εμφάνισης του παθογόνου (Bhunia, 2008). Το γεγονός αυτό ενισχύεται και από την ικανότητα του μικροοργανισμού να διεισδύει εντός των φυτικών ιστών και να εσωτερικοποιείται (Kroupitski *et al.*, 2009), καθιστώντας έτσι τις κοινώς χρησιμοποιούμενες μεθόδους απολύμανσης των λαχανικών αναποτελεσματικές (Ibarra-Sanchez, 2002).

Παρά το γεγονός ότι έχουν γίνει αρκετές μελέτες που αφορούν την εσωτερικοποίηση του παθογόνου σε φυλλώδη λαχανικά, υπάρχουν αρκετά κενά στην υπάρχουσα βιβλιογραφία. Μέχρι στιγμής έχει γίνει κυρίως μικροσκοπική αποτύπωση και εκτίμηση του φαινομένου της εσωτερικοποίησης του παθογόνου σε διάφορα λαχανικά (Gomes *et al.*, 2009; Kroupitski *et al.*, 2009; Goldberg *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2012), χωρίς όμως να έχει γίνει εκτενής ποσοτικοποίηση του φαινομένου (καταμέτρηση του πληθυσμού των εσωτερικοποιημένων και προσκολλημένων κυττάρων). Τα ερωτήματα όμως τα οποία τίθενται είναι πως επιδρά το είδος, η επιφάνεια, η δομή, τα θρεπτικά συστατικά και η παρουσία της ενδογενούς χλωρίδας του εκάστοτε λαχανικού στο φαινόμενο της εσωτερικοποίησης? Πως επηρεάζεται το φαινόμενο από τη θερμοκρασία και τον χρόνο συντήρησης? Πώς επηρεάζουν οι παραπάνω παράμετροι την μετέπειτα φυσιολογία των εσωτερικοποιημένων κυττάρων?

Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής (Χιλιάι Νικολίν) επιβεβαιώθηκε το φαινόμενο της εσωτερικοποίησης του παθογόνου *Salmonella* spp. σε φυλλώδη λαχανικά (σπανάκι, μαρούλι, βλίτα) και μελετήθηκε σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία και τον χρόνο συντήρησης. Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση του πληθυσμού των εσωτερικοποιημένων κυττάρων μεταξύ των διαφορετικών λαχανικών. Επιπλέον, έναντι συνθηκών όξινης καταπόνησης τα εσωτερικοποιημένα κύτταρα βρέθηκε ότι ήταν πιο ευαίσθητα συγκριτικά με τα προσκολλημένα, ενώ παρατεταμένη παραμονή του

παθογόνου σε συγκεκριμένα λαχανικά (βλίτα και μαρούλι) οδήγησε σε εξίσωση της οξεοανθεκτικότητας των προσκολλημένων και εσωτερικοποιημένων πληθυσμών. Σε μελέτη έκφρασης των γονιδίων που πραγματοποιήθηκε, παρατηρήθηκε ότι εποίκιση σε βλίτα είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή γονιδίων του T3SS (*invA*, *prgH*, *avrA*, *ssrB*) στα προσκολλημένα κυρίως κύτταρα, καθώς και τη μεταβολή των επιπέδων έκφρασης του *cadB*, χωρίς όμως να υπάρχει απόλυτη συσχέτιση με την απόκριση του παθογόνου.

Με βάση λοιπόν τα παραπάνω ερωτήματα και ως συνέχεια της προηγούμενης ερευνητικής δραστηριότητας ο **σκοπός** της παρούσας έρευνας είναι η μελέτη:

- της ικανότητας του παθογόνου *Salmonella* Enteritidis να εποικίζει επιφάνειες διαφορετικών φυλλωδών λαχανικών, να προσκολλάται (attached cells) ή να εσωτερικοποιείται (internalized cells),
- της παραλλακτικότητας μεταξύ διαφορετικών οροτύπων του παθογόνου στην ικανότητα εποίκησης φυλλικών επιφανειών,
- της μετέπειτα φυσιολογίας-οξεοανθεκτικότητας των κυττάρων των παραπάνω κατηγοριών (προσκολλημένων και εσωτερικοποιημένων) έναντι ακραίας όξινης καταπόνησης,
- παραγόντων όπως η σύσταση του λαχανικού, η παρουσία ενδογενούς χλωρίδας και η μικροδομή του τροφίμου (υποστρώματος) στην μετέπειτα απόκριση του μικροοργανισμού έναντι όξινης καταπόνησης
- της πιθανής μεταβολής των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που είναι γνωστό ότι σχετίζονται με την παθογένεια και τη λοιμωξιογόνο δράση του μικροοργανισμού καθώς και με μηχανισμούς προσαρμογής και αντιμετώπισης έναντι ακραίων συνθηκών.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Αναλώσιμα υλικά

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας μελέτης και τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε μια πληθώρα υλικών, που περιελάμβανε ανόργανα και οργανικά αντιδραστήρια καθώς και τυποποιημένα σκευάσματα θρεπτικών υποστρωμάτων.

#### 2.1.1 Χημικά αντιδραστήρια

Από πλευράς χημικών αντιδραστηρίων χρησιμοποιήθηκαν: α) υδροχλώριο HCl (6N) (Merck, 22038, Germany) και β) νιτρικός άργυρος AgNO<sub>3</sub> (1% w/v) (Applichem Pancreac, A1376, USP).

#### 2.1.2 Θρεπτικά υποστρώματα

Σε όλη την πειραματική διαδικασία τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Tryptic Soy Broth (TSB) (LAB M, LAB004, United Kindom) του οποίου το pH σε υδατικό διάλυμα ρυθμιζόταν με υδροχλωρικό οξύ (HCl) (6N), στα πειράματα όξινης καταπόνησης (acid challenge).
- Tryptic Soy Agar (TSA) (LAB M, LAB011, United Kindom). Χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια μιας ευρείας ποικιλίας αερόβιων και αναερόβιων μικροοργανισμών, και συγκεκριμένα για την εκτίμηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας των λαχανικών (OMX).
- Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) (LAB M, LAB032, United Kindom). Το XLD Agar (Άγαρ Ξυλόζης Λυσίνης Δεσοξυχολικού άλατος) αποτελεί ένα μετρίως εκλεκτικό και διαφορικό υλικό που χρησιμοποιείται για την απομόνωση και διαφοροποίηση αρνητικών κατά Gram εντερικών παθογόνων (*Salmonella* και *Shigella*). Ως πηγή θρεπτικών συστατικών και βιταμινών περιέχει εκχύλισμα ζυμομυκήτων. Η χρήση του δεσοξυχολικού νατρίου που περιέχει, ως εκλεκτικό

παράγοντα, το καθιστά ανασταλτικό για την ανάπτυξη των θετικών κατά Gram μικροοργανισμών. Σε ότι αφορά τον τρόπο δράσης του, η ξυλόζη ενσωματώνεται στο υλικό καθώς ζυμώνεται από όλους σχεδόν τους εντερικούς οργανισμούς εκτός από τα είδη του γένους *Shigella* και η ιδιότητά της αυτή επιτρέπει τη διαφοροποίησή τους. Η λυσίνη περιλαμβάνεται, επίσης, ώστε να επιτρέπεται η διαφοροποίηση των ειδών του γένους *Salmonella* από τους μη παθογόνους οργανισμούς, γιατί χωρίς τη λυσίνη, τα είδη του γένους *Salmonella* θα ζύμωναν ταχέως την ξυλόζη με αποτέλεσμα να μην υπήρχε διάκριση τους από τα μη παθογόνα είδη. Αφού εξαντλήσουν τα είδη *Salmonella* την προμήθεια ξυλόζης, στη συνέχεια χρησιμοποιούν τη λυσίνη μέσω του ενζύμου αποκαρβοξυλάση της λυσίνης, με αναστροφή σε αλκαλικό pH που μιμείται την αντίδραση του *Shigella*. Για να ενισχυθεί η ικανότητα διαφοροποίησης της σύνθεσης, στο υλικό περιλαμβάνεται ένα σύστημα δείκτη  $H_2S$ , που αποτελείται από θειοθειικό νάτριο και κιτρικό σίδηρο(III)αμμώνιο, για την οπτικοποίηση της παραγωγής υδρόθειου, που οδηγεί στο σχηματισμό αποικιών με μαύρο κέντρο. Οι μη παθογόνοι οργανισμοί που παράγουν  $H_2S$  δεν επιτυγχάνουν αποκαρβοξυλίωση της λυσίνης, συνεπώς, η όξινη αντίδραση που παράγεται από αυτά τα εμποδίζει να δημιουργήσουν το μαύρο χρώμα στις αποικίες, το οποίο προκύπτει μόνο σε ουδέτερο ή αλκαλικό pH (Taylor, 1965).

## 2.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Η εργαστηριακή υποδομή που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας περιελάμβανε διάφορα σκεύη, όργανα και συσκευές τα οποία αναφέρονται και τα στοιχεία τους παρουσιάζονται όπου αυτά χρησιμοποιήθηκαν.

## 2.3 Μικροβιακά στελέχη

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκε η συμπεριφορά τριών στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella enterica* subsp. *enterica* υπό συγκεκριμένες

συνθήκες καταπονήσεων. Τα μελετηθέντα στελέχη προέρχονται από συλλογή απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών που διατηρεί το εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων (Πίνακας 2.3). Η συντήρηση των μικροοργανισμών γινόταν στους -20° C σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα, παρουσία γλυκερόλης σε ποσοστό 20% v/v του συνολικού όγκου.

**Πίνακας 2.1:** Τα τρία στελέχη σαλμονέλας που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Κωδικός	Στέλεχος	Εργαστηριακός αριθμός	Προέλευση
PS1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	4/74	Εντερικό σύστημα μοσχαριού
PS4	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Infantis	167	Ζωοτροφές
PS12	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis PTA P167807	PT4	Ζωοτροφές

#### 2.4 Φυλλώδη Λαχανικά

Τα λαχανικά που χρησιμοποιήθηκαν για την επίτευξη των πειραμάτων στην παρούσα μελέτη ήταν το σπανάκι (*Spinacia oleracea*), το μαρούλι (*Lactuca sativa*), τα χόρτα βλίτα (*Amaranthus viridis*), τα ιταλικά χόρτα (*Cichorium endivia*) και η ρόκα (*Eruca sativa*). Όλα τα λαχανικά προμηθεύτηκαν από την τοπική υπεραγορά, και προέρχονταν από έναν με δύο προμηθευτές.

#### 2.5 Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε και οι μικροβιακοί χειρισμοί που διενεργήθηκαν – σε κάθε περίπτωση υπό ασηπτικές συνθήκες – παρουσιάζονται στα

ακόλουθα διαγράμματα ροής (Σχήματα 1 και 2), ενώ για λόγους επαναληψιμότητας πραγματοποιούνταν διπλή επανάληψη του όλου πειράματος.

### 2.5.1 Ανανέωση των μικροοργανισμών

Πρόκειται για το στάδιο εκείνο το οποίο μεσολαβεί πριν από τον ενοφθαλμισμό των μικροοργανισμών σε κάποιο υπόστρωμα, προκειμένου να ανακτήσουν οι μικροοργανισμοί τη ζωτικότητά τους και να καταστούν άμεσα έτοιμοι για ανάπτυξη. Η ανανέωση διαρκεί 18 – 24 ώρες οπότε και οι μικροοργανισμοί τοποθετούνται σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSB broth με ακόλουθη επώαση σε θερμοκρασία 37°C. Συγκεκριμένα, εισάγεται ποσότητα ενοφθαλμίσιματος σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 10 ml TSB broth και ακολουθεί σε κάθε περίπτωση επώαση στους 37°C για 18 - 24 ώρες.

#### Προετοιμασία εμβολίων

- Έγιναν δύο ανανεώσεις (υπό ασηπτικές συνθήκες):
  - Η πρώτη περιλάμβανε λήψη 100 μL κυττάρων *Salmonella* από την τράπεζα κυττάρων μικροοργανισμών του εργαστηρίου (stock) και την προσθήκη τους σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 10 mL TSB και εν συνεχεία επώαση στους 37 °C για 24 h.
  - Η δεύτερη περιλάμβανε τη μεταφορά 100 μL από τους δοκιμαστικούς σωλήνες της πρώτης ανανέωσης σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 10 mL TSB και εν συνεχεία επώαση στους 37 °C για 18 h.
- Χρήση της τεχνικής της γραμμωτής ράβδωσης (streaking) με σκοπό τον σχηματισμό μεμονωμένων αποικιών του βακτηρίου και επώαση στους 37°C για 24 h.
  - Έπειτα πρώτη ανανέωση, με τοποθέτηση μιας αποικίας σε δοκιμαστικό σωλήνα με 10 mL TSB και εν συνεχεία επώαση στους 37 °C για 24 h.
  - Η δεύτερη ανανέωση περιλάμβανε τη μεταφορά 100 μL από τους δοκιμαστικούς σωλήνες της πρώτης ανανέωσης σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 10 mL TSB και εν συνεχεία επώαση στους 37 °C για 18 h.

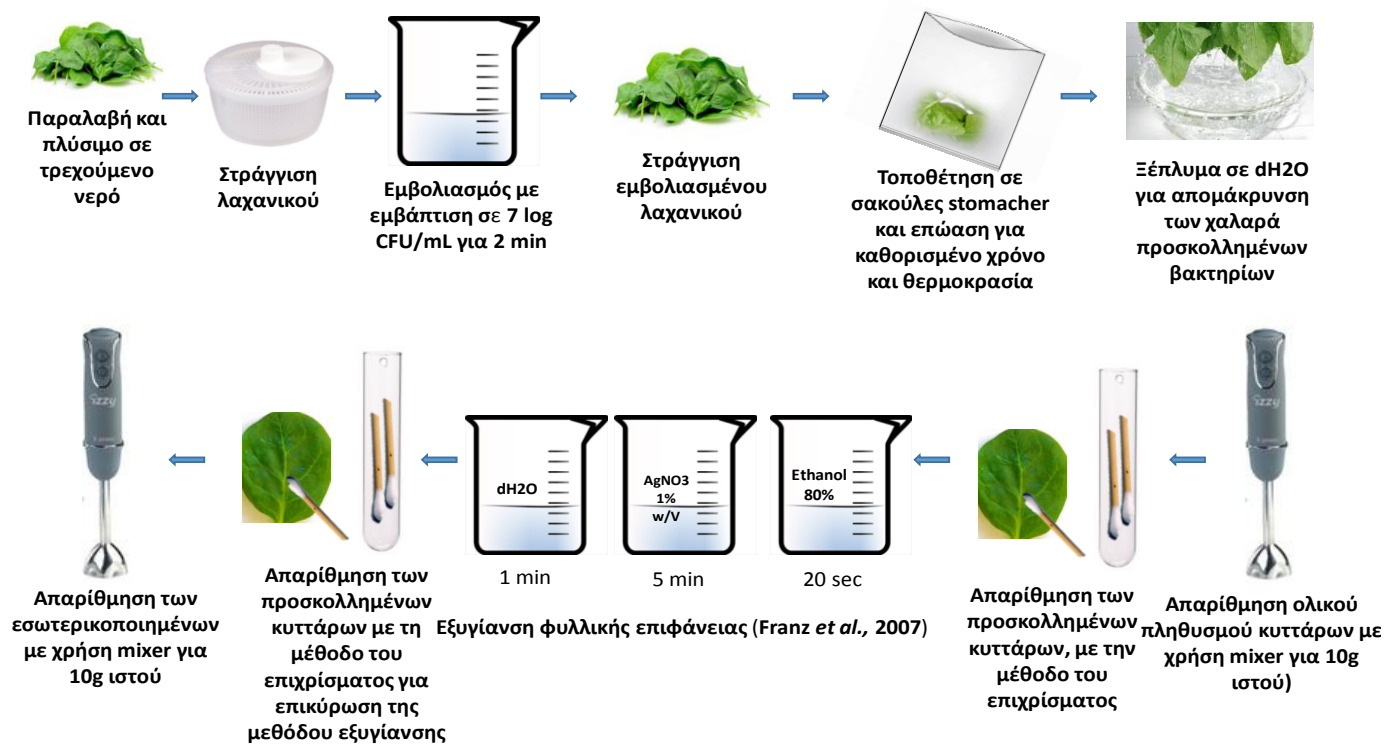
- Για τον καθαρισμό του εμβολίου έγινε:
  - Φυγοκέντρηση στις 3600 rpm για 10 min στους 4 °C.
  - Απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 10 mL ισοτονικό διάλυμα ¼ strength Ringer's solution (2 φορές).

Ο καθαρισμός του εμβολίου είχε ως σκοπό την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και όλων των μικροβιακών μεταβολιτών που υφίστανται στο μέσο. Μετά τον καθαρισμό πραγματοποιούνταν δειγματοληψία του τελικού εμβολίου σε ορισμένες από τις πειραματικές διαδικασίες για την εξακρίβωση του αρχικού πληθυσμού *Salmonella*.

### **2.5.2 Πειράματα εκτίμησης ολικών, προσκολλημένων και εσωτερικοποιημένων κυττάρων του παθογόνου μικροοργανισμού στα λαχανικά.**

Η πειραματική διαδικασία, που ακολουθεί μετά την ανανέωση των μικροοργανισμών και τον καθαρισμό του εμβολίου απεικονίζεται στο Σχήμα 1.





**Σχήμα 1:** Πειραματική πορεία εκτίμησης ολικών, προσκολλημένων και εσωτερικοποιημένων κυττάρων του μικροοργανισμού στα φυλλώδη λαχανικά.

### 2.5.2.1 Εμβολιασμός λαχανικών

Αρχικά τα λαχανικά ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο, κρύο νερό βρύσης και στη συνέχεια ακολούθησε στράγγιση τους, προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια νερού. Ύστερα εμβολιάστηκαν με τον παθογόνο μικροοργανισμό (αρχικού πληθυσμού 9 log CFU/mL), με τη μέθοδο της εμβάπτισης κατά την οποία τα λαχανικά τοποθετήθηκαν για 2 min υπό ελαφρά ανάδευση σε δοχείο με αραιωτικό ¼ strength Ringer's solution με τελικό πληθυσμό του μικροοργανισμού 7 log CFU/mL. Παρόλο που βιβλιογραφικά έχει

αναφερθεί και ως μέθοδος εμβολιασμού η μέθοδος της έγχυσης, η μέθοδος της εμβάπτισης επιλέχτηκε με βάση τα αποτελέσματα προηγούμενης πειραματικής μελέτης που εκπονήθηκε στο εργαστήριο και έδειχνε ότι με τη μέθοδο της έγχυσης, όπως ήταν αναμενόμενο, προέκυπτε μεγαλύτερος πληθυσμός εσωτερικοποιημένων κυττάρων λόγω της «τεχνητής» ώθησης του εμβολίου στο εσωτερικό της επιφάνειας του λαχανικού με τη χρήση σύριγγας. Αντίθετα, με τη μέθοδο της εμβάπτισης, οι συνθήκες επιμόλυνσης ήταν πιο ρεαλιστικές καθώς η εσωτερικοποίηση του παθογόνου λάμβανε χώρα μέσω φυσικών οπών των φύλλων, όπως τα στομάτια (Itoh *et al*, 1998; Seo *et al*, 1999; Takeuchi *et al*, 2001) καθώς επίσης και μέσω τραυμάτων στην επιφάνεια των φύλλων (Barker-Reid *et al.*, 2009).

Έπειτα από τον εμβολιασμό, οι απαραίτητες ποσότητες λαχανικών τοποθετούνταν είτε στους 5 °C είτε στους 20 °C όπου παρέμεναν είτε για 2 h είτε για 2 ημέρες (48 h) έως την δειγματοληψία-υποβολή σε καταπόνηση. Με το πέρας του προκαθορισμένου χρόνου επώασης τα λαχανικά πριν την δειγματοληψία ξεπλένονταν σε δοχείο με απιονισμένο νερό για την απομάκρυνση των χαλαρά προσκολλημένων κυττάρων του παθογόνου.

#### 2.5.2.2 Δειγματοληψία

- Ολική Μεσόφιλη χλωρίδα (OMX): Ποσότητα 0.1 mL από την κατάλληλη δεκαδική αραιώση ενοφθαλμίστηκε, υπό ασηπτικές συνθήκες, με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης (spread) σε τρυβλία με μη επιλεκτικό υπόστρωμα TSA. Ακολούθησε επώαση στους 30 °C για 2 ημέρες και καταμέτρηση όλων των αποικιών που αναπτύχθηκαν.
  
- *Salmonella* spp.

Ο προσδιορισμός του πληθυσμού του εκάστοτε δείγματος έγινε σε κάθε θερμοκρασία (5 °C και 20 °C) και χρόνο (2 h και 48 h). Για κάθε δείγμα διενεργήθηκαν 2 επαναλήψεις.

- Προσδιορισμός συνολικού πληθυσμού (total) του παθογόνου μικροοργανισμού: 10 g λαχανικού αραιώθηκαν σε ισοτονικό διάλυμα Ringer (1:10) και ομογενοποιήθηκαν με χρήση ομογενοποιητή χειρός (hand mixer).
- Προσδιορισμός του πληθυσμού των προσκολλημένων κυττάρων του παθογόνου στην επιφάνεια του λαχανικού έγινε με την μέθοδο επιχρίσματος (swabbing) (βλέπε 2.5.2.2.α). Χρησιμοποιήθηκαν 2 αποστειρωμένοι στείλεοί για τη «σάρωση» 10 g λαχανικού οι οποίοι εμβαπτίστηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 10 mL ισοτονικό διάλυμα Ringer.
- Προσδιορισμός του εσωτερικοποιημένου πληθυσμού του παθογόνου έγινε αφού είχε προηγηθεί η εξυγίανση της επιφάνειας του λαχανικού (βλέπε 2.5.2.2.β). Συγκεκριμένα, 10 g λαχανικού αραιώθηκαν σε Ringer (1:10) και ομογενοποιήθηκαν με χρήση ομογενοποιητή χειρός.

Όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε σακούλες stomacher με φίλτρο και στη συνέχεια, ακολούθησαν οι διαδοχικές αραιώσεις και η επίστρωση τους σε τρυβλία TSA (βλέπε 2.5.2.2.γ και 2.5.2.2.δ). Μετά το πέρας της 1.5 ώρας, ακολούθησε δεύτερη στρώση με προσθήκη 8 mL XLD στα τρυβλία και επώαση στους 37 °C για 24 h.

#### 2.5.2.2.α Μέθοδος επιχρίσματος (swabbing)

Αποστειρωμένοι βαμβακοφόροι στείλεοί διαποτίζονται με κατάλληλο αραιωτικό διάλυμα και στη συνέχεια χρησιμοποιούνται για τη σάρωση, εφαρμόζοντας ήπια πίεση, της εξεταζόμενης επιφάνειας. Ο προσδιορισμός του μικροβιακού φορτίου γίνεται με την τοποθέτηση του βαμβακοφόρου στείλεού σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα με αραιωτικό διάλυμα και ακολουθεί η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων.



**Εικόνα 2.5.2.2.α** Εφαρμογή μεθόδου επιχρίσματος σε φύλλο λαχανικού

#### **2.5.2.2.β Μέθοδος εξυγίανσης επιφάνειας**

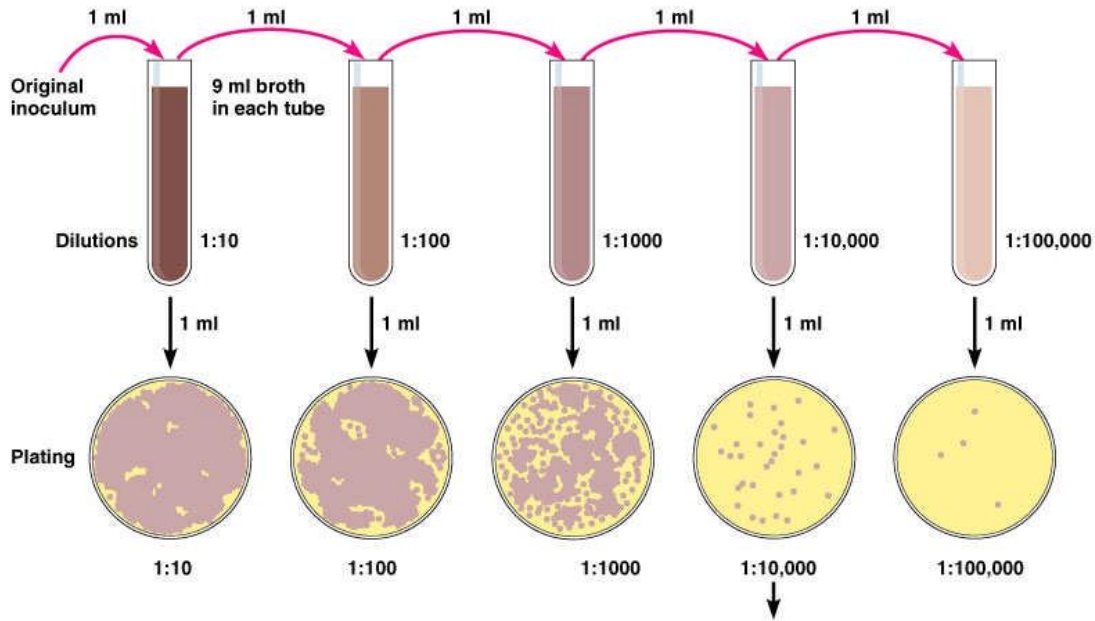
Με σκοπό την εύρεση της κατάλληλης μεθόδου εξυγίανσης προκειμένου να μην αλλοιώνονται τα οργανοληπτικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των λαχανικών δοκιμάστηκαν η χλωρίνη (NaClO), 100% αιθανόλη και ο νιτρικός άργυρος (AgNO<sub>3</sub>). Λόγω της αλλοίωσης του φυτικού ιστού από την χλωρίνη και την αιθανόλη, η μέθοδος που εφαρμόστηκε για την εξυγίανση της επιφάνειας των λαχανικών περιλάμβανε διαδοχικά τα στάδια (Franz *et al.*, 2007):

- Εμβάπτιση σε διάλυμα 80 % v/v αιθανόλης για 20 sec
- Εμβάπτιση σε διάλυμα 1 % w/v AgNO<sub>3</sub> για 5 min
- Ξέπλυμα σε απιονισμένο νερό για 1 min

Ύστερα από κάθε εφαρμογή της μεθόδου για την επαλήθευση της ορθής εξυγίανσης, σε δείγμα λαχανικού εφαρμοζόταν η μέθοδος προσδιορισμού των προσκολλημένων κυττάρων με την μέθοδο επιχρίσματος. Συγκεκριμένα, 2 αποστειρωμένοι στείλεοί χρησιμοποιήθηκαν για τη «σάρωση» 10 g λαχανικού και στη συνέχεια εμβάπτιστηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 10 mL ισοτονικό διάλυμα Ringer solution. Έπειτα, ποσότητα 1 mL, ενοφθαλμίστηκε υπό ασηπτικές συνθήκες, με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης σε τριπλό τρυβλίο, με επιλεκτικό υπόστρωμα XLD.

#### **2.5.2.2.γ Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων**

Ο προσδιορισμός του μικροβιακού φορτίου χρειάζεται μία διαδικασία διαχωρισμού των βακτηρίων, ώστε όταν καλλιεργηθούν σε ένα θρεπτικό υλικό, να σχηματίζουν μεμονωμένες και ευκρινείς αποικίες. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων.



Εικόνα 2.5.2.2.γ: Μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων.

#### 2.5.2.2.δ Τεχνική επιφανειακής επίστρωσης (spread plate technique)

Εφαρμόζεται γενικά για αερόβιους μικροοργανισμούς και είναι η εξάπλωση γνωστού όγκου (0.1 mL) βακτηριακού εναιωρήματος σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.

#### 2.5.3 Μέθοδος απαρίθμησης βακτηριακών αποικιών

Η μέθοδος απαρίθμησης βακτηριακών αποικιών αφορά την καταμέτρηση των αποικιών που σχηματίζονται σε στερεό θρεπτικό υλικό κατά την εξάπλωση ή ενσωμάτωση γνωστής συγκέντρωσης εμβολίου. Εκφράζεται σε μονάδα σχηματιζόμενων αποικιών (Colony Forming Units, CFU).

$\log (\text{CFU/g}) = \log ((\text{μέσος όρος αριθμού αποικιών}) \cdot \text{αραιώση} \cdot 1/V)$  όπου V: ο όγκος (mL) που προστίθεται στο τρυβλίο.

#### 2.5.4 Έκθεση σε όξινη καταπόνηση

Με στόχο τη μελέτη της φυσιολογίας του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* Enteritidis μετά από παραμονή επάνω ή μέσα στο φυτικό ιστό, ο παθογόνος εκτέθηκε σε ακραία όξινη καταπόνηση προσομοιάζοντας το περιβάλλον (pH) του στομάχου. Για το λόγο αυτό, η όξινη καταπόνηση πραγματοποιήθηκε στους 37°C σε εργαστηριακό θρεπτικό υλικό TSB του οποίου το pH ρυθμίστηκε στο 2.7 υπό ασηπτικές συνθήκες με χρήση HCl (6N). Η επιλογή ρύθμισης του pH στο 2.7 έγινε με βάση δεδομένα προηγούμενης ερευνητικής δραστηριότητας του εργαστηρίου κατά την οποία πλαγκτονικά κύτταρα του μικροοργανισμού εκτέθηκαν σε pH 2.0, 2.5, 2.7 και 2.9. Σε pH 2.0 δεν παρατηρήθηκε επιβίωση του παθογόνου ακόμα και τη χρονική στιγμή t=0. Επιπλέον, όσο χαμηλότερη ήταν η τιμή του pH στο οποίο υποβαλλόταν ο παθογόνος τόσο μικρότερη η επιβίωση του. Αντίθετα, σε pH 2.9, η ανάπτυξη του μικροοργανισμού επηρεάστηκε ελάχιστα. Τελικά, ο παθογόνος επιλέχθηκε να εκτίθεται σε pH 2.7 λόγω της ομαλότερης μείωσης του πληθυσμού που παρατηρήθηκε κατά την έκθεση των πλαγκτονικών κυττάρων καθιστώντας έτσι πιο διακριτές τις πιθανές διαφορές στην απόκριση του παθογόνου.

##### 2.5.4.1 Μελέτη ανοχής ολικών, προσκολλημένων και εσωτερικοποιημένων κυττάρων *Salmonella* σε χαμηλό pH.

Η υποβολή σε όξινη καταπόνηση των εμβολιασμένων με *S. Enteritidis* λαχανικών πραγματοποιήθηκε ύστερα από συντήρησή τους για 2 h και 48 h σε θερμοκρασία 5 °C και 20 °C. Σε κάθε χρονική στιγμή υποβάλλονταν σε όξινη καταπόνηση οι παρακάτω κατηγορίες δειγμάτων-πληθυσμών *S. Enteritidis*.

- Συνολικός πληθυσμός (total) του παθογόνου μικροοργανισμού: 10 g λαχανικού αραιώθηκαν (1:10) σε TSB με χαμηλό pH και ομογενοποιήθηκαν με χρήση ομογενοποιητή χειρός.

- Προσκολλημένα κύτταρα του παθογόνου στην επιφάνεια του λαχανικού: έγινε με τη μέθοδο επιχρίσματος (swabbing). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 2 βαμβακοφόροι στειλεοί για τη «σάρωση» 10 g λαχανικού, οι οποίοι στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε 10 mL πούλπας λαχανικού. Η πούλπα λαχανικού είχε προκύψει από αραίωση (1:10), 10 g του λαχανικού σε TSB με χαμηλό pH και ομογενοποίηση τους με ομογενοποιητή χειρός (mixer). Ο ομογενοποιημένος ιστός λαχανικού προστίθετο ώστε τα κύτταρα να εκτεθούν στις ίδιες συνθήκες με τα ολικά και εσωτερικοποιημένα κύτταρα καθώς η παρουσία ιστού ενδέχεται να έχει προστατευτικό ρόλο για τα κύτταρα κατά την έκθεσή τους σε όξινη καταπόνηση. Επιπλέον, η έκθεση του παθογόνου σε ακραία όξινη καταπόνηση παρουσία φυτικού ιστού προσομοιάζει καλύτερα το περιβάλλον στο οποίο θα εκτεθούν τα βακτηριακά κύτταρα στο εσωτερικό του ανθρώπινου στομάχου, δεδομένου ότι η μάσηση του λαχανικού και συνεπώς η ομογενοποίησή του θα έχει ήδη προηγηθεί σε προηγούμενο στάδιο.

- Εσωτερικοποιημένα κύτταρα του παθογόνου αφότου είχε προηγηθεί η εξυγίανση της επιφάνειας του λαχανικού. 10 g λαχανικού αραιώνονταν (1:10) σε TSB με χαμηλό pH και ομογενοποιήθηκαν με χρήση ομογενοποιητή χειρός.

Η όξινη καταπόνηση πραγματοποιούταν στους 37 °C για συνολικό χρόνο έως 75 min, ενώ η καταμέτρηση του παθογόνου λάμβανε χώρα ανά 15 min με επίστρωση του παθογόνου σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ακολουθώντας την τεχνική διπλής στρώσης (TSA, XLD) για την καλύτερη ανάκτηση τραυματισμένων κυττάρων. Η επιβίωση του παθογόνου εκφράστηκε ως ο λόγος των επιβιωσάντων κυττάρων σε χρόνο  $t_x$  προς τον αρχικό πληθυσμό σε χρόνο  $t_0$ .

#### **2.5.4.2 Ανάκτηση τραυματισμένων κυττάρων-Τεχνική διπλής στρώσης**

Είναι γνωστό ότι κύτταρα *Salmonella* spp τα οποία επιστρώνονται σε επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα (XLD), ενώ έχει προηγηθεί η υποβολή τους σε ισχυρή καταπόνηση ενδέχεται, είτε λόγω τραυματισμού είτε λόγω της επιπλέον καταπόνησης που προκαλεί το ίδιο το επιλεκτικό υπόστρωμα να αδυνατούν να αναπτυχθούν με αποτέλεσμα την

υποεκτίμηση του πληθυσμού των επιβιωσάντων κυττάρων (Ray and Adams, 1984; Reissbrodt *et al.*, 1996; Kang and Fung, 1999). Σύμφωνα με τους Kang and Fung (2000), επίστρωση των βακτηριακών κυττάρων αρχικά σε μη επιλεκτικό μέσο (TSA) και εφαρμογή δεύτερης στρώσης επιλεκτικού μέσου (XLD) 7 mL μετά από επώαση των τρυβλίων για 1,5 h σε θερμοκρασία 37 °C έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη ανάκτηση τραυματισμένων κυττάρων και συνεπώς πιο αξιόπιστη εκτίμηση του βακτηριακού πληθυσμού. Η καλύτερη ανάκτηση επιτυγχάνεται διότι οι επιλεκτικοί παράγοντες του στρώματος XLD διαχέονται στο κατώτερο στρώμα TSA αφού τα τραυματισμένα κύτταρα έχουν ανακάμψει με αποτέλεσμα να απαριθμούνται τραυματισμένα και μη κύτταρα *Salmonella*.

### **2.5.5 Μέτρηση pH**

Ο προσδιορισμός του pH των δειγμάτων και η ρύθμιση του pH του θρεπτικού μέσου για την έκθεση στην όξινη καταπόνηση πραγματοποιήθηκε σε pHμετρο (WTW pH Meter 526). Η μέτρηση του pH των δειγμάτων γινόταν τόσο στα ανεμβολίαστα όσο και στα εμβολιασμένα δείγματα λαχανικών καθώς και πριν και μετά την υποβολή σε συνθήκες όξινης καταπόνησης.

### **2.6 Μελέτη στελεχών *Salmonella* ως προς το βαθμό προσκόλλησης και εσωτερικοποίησης στην επιφάνεια φυτικού ιστού**

Με σκοπό τη μελέτη των διαφορετικών στελεχών *Salmonella* ως προς το βαθμό προσκόλλησης και εσωτερικοποίησης τους, λαχανικά εμβολιάστηκαν με το εκάστοτε βακτηριακό στέλεχος και ακολούθησε καταμέτρηση των ολικών (total), προσκολλημένων (attached) και εσωτερικοποιημένων (internalized) κυττάρων *Salmonella* spp.. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν τρία στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού και εμβολιάστηκαν με την μέθοδο της εμβάπτισης (7 log CFU/g) σε πέντε λαχανικά. Τα στελέχη που επιλέχθηκαν ήταν ο *S. Typhimurium*, ο *S. Infantis* και ο



*S. Enteritidis*. Ο εμβολιασμός έγινε σε σπανάκι, μαρούλι, χόρτα βλίτα, ιταλικά χόρτα και ρόκα, τα οποία στην συνέχεια επωάστηκαν είτε στους 5 °C είτε στους 20 °C για 2 h και 48 h. Η διαδικασία προσδιορισμού των ολικών, προσκολλημένων και εσωτερικοποιημένων κυττάρων αναφέρεται αναλυτικά παραπάνω (βλέπε 2.5.2.2).

## 2.7 Εκτίμηση της Ολικής Μεσόφιλης Μικροχλωρίδας (OMX) των λαχανικών

Με σκοπό να εκτιμηθούν οι μικροοργανισμοί που απαντώνται στα λαχανικά, που διενεργήθηκαν τα πειράματα μας, καθώς και το τι ποσοστό αυτών αποτελεί τον ολικό, τον προσκολλημένο και τον εσωτερικοποιημένο πληθυσμό, έγινε δειγματοληψία των λαχανικών και επίστρωση ή ενσωμάτωση τους (ανάλογα με το θρεπτικό υπόστρωμα) σε διάφορα υποστρώματα. Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Tryptic Soy Agar (TSA) (LAB M, LAB011, United Kindom). Χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια μιας ευρείας ποικιλίας αερόβιων και αναερόβιων μικροοργανισμών, και συγκεκριμένα για την εκτίμηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας των λαχανικών (OMX).
- Pseudomonas Agar Base (CFC) (LAB M, LAB108, United Kindom). Εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση και τον προσδιορισμό των ψευδομονάδων.
- Rose Bengal Chloramphenicol Agar Base (RBC) (LAB M, LAB036, United Kindom). Εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση και την καταμέτρηση των μυκήτων και των ζυμών στα λαχανικά.
- Violet Red Bile Glucose Agar (V.R.B.G.A) (LAB M, LAB088, United Kindom). Χρησιμοποιήθηκε ως εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για την καταμέτρηση των εντεροβακτηρίων. Περιέχει γλυκόζη η οποία ζυμώνεται από όλα τα μέλη της οικογένειας Enterobacteriaceae ενώ τα χολικά άλατα καθώς και το κρυσταλλικό ιώδες χρησιμοποιούνται για την αναστολή της ανάπτυξης των Gram- θετικών και των μη εντερικών βακτηρίων. Η επιφανειακή επίστρωση εξασφαλίζει μη αναερόβιες συνθήκες και καταστέλλει την ανάπτυξη των μη-ζυμούμενων Gram-αρνητικών βακτηρίων.

- M.R.S (LAB M, LAB223, United Kindom). Χρησιμοποιήθηκε ως εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για την καταμέτρηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

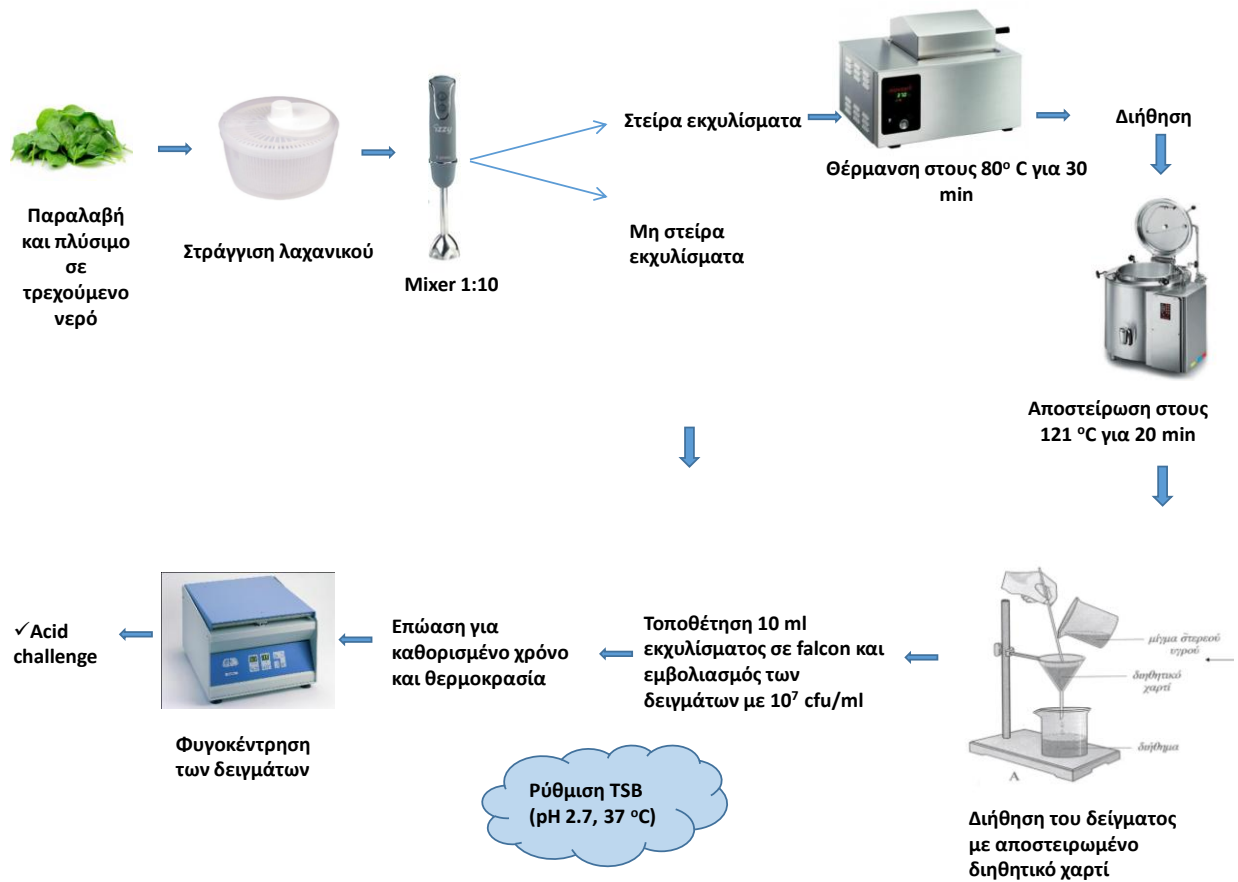
## 2.8 Πειράματα μελέτης φυτικών εκχυλισμάτων

### 2.8.1 Μελέτη της μείωσης του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella spp.* σε εκχυλίσματα φυλλωδών λαχανικών μετά από έκθεση σε όξινη καταπόνηση.

Αφού μελετήθηκε η κινητική του παθογόνου μικροοργανισμού στα φυλλώδη λαχανικά, γεννήθηκε το ερώτημα πως επιδρά άραγε η σύσταση και η απελευθέρωση των θρεπτικών συστατικών του εκάστοτε λαχανικού στην επιβίωση, την ανάπτυξη ή τη μείωση του παθογόνου καθώς και τι ρόλο παίζει η απουσία ή η παρουσία της ενδογενούς μικροχλωρίδας; Με βάση τα ερωτήματα αυτά σχεδιάστηκε μια σειρά πειραμάτων όπου εκχυλίσματα λαχανικών εμβολιάστηκαν με *Salmonella spp.* και εκτέθηκαν σε ακραίες συνθήκες όξινης καταπόνησης.

Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι σε προπειράματα που έγιναν στα λαχανικά εξετάστηκαν δύο διαφορετικοί τρόποι ομογενοποίησης του φυτικού ιστού (ομογενοποίηση με Stomacher και ομογενοποίηση με ομογενοποιητή χειρός), και τελικά επιλέχθηκε ο ομογενοποιητής χειρός καθώς ο τρόπος αυτός επέτρεπε την καλύτερη δυνατή απελευθέρωση των θρεπτικών στοιχείων του εκάστοτε λαχανικού καθώς και των εν δυνάμει παρεμποδιστικών για την ανάπτυξη του παθογόνου ουσιών, με αποτέλεσμα την καλύτερη μελέτη της φυσιολογίας του παθογόνου.

Η πειραματική διαδικασία, που ακολουθεί μετά την ανανέωση των μικροοργανισμών και τον καθαρισμό του εμβολίου απεικονίζεται στο Σχήμα 2.



**Σχήμα 2:** Προετοιμασία των φυτικών εκχυλισμάτων για υποβολή σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (acid challenge).

Αρχικά τα λαχανικά ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο, κρύο νερό βρύσης και ακολούθησε στράγγιση τους, προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια νερού. Στη συνέχεια, έγινε ομογενοποίηση του φυτικού ιστού με χρήση ομογενοποιητή χειρός (hand mixer) (αραίωση 1:10 σε Ringer). Στο σημείο αυτό διακρίθηκαν δύο περιπτώσεις εκχυλισμάτων: α) τα μη στείρα εκχυλίσματα και τα β) τα στείρα εκχυλίσματα, που σκοπό είχαν να ερμηνεύσουν το πώς επιδρά η ενδογενής μικροχλωρίδα των λαχανικών στην επιβίωση, την ανάπτυξη ή τη μείωση του παθογόνου. Σε ότι αφορά τα μη στείρα εκχυλίσματα, μετά την ομογενοποίηση των λαχανικών, 10 mL του εκάστοτε εκχυλίσματος τοποθετήθηκαν σε falcon και εμβολιάστηκαν με  $10^7$  CFU/mL *Salmonella*. Αντίθετα, στα στείρα εκχυλίσματα μετά την ομογενοποίηση των λαχανικών, ακολούθησε

τοποθέτηση τους σε Duran και εν συνεχεία σε υδατόλουτρο στους 80 °C για 15-30 min με σκοπό την μετουσίωση των ενζύμων και των πρωτεϊνών των λαχανικών και τη δημιουργία δύο διακριτών φάσεων. Έπειτα, τα δείγματα διηθήθηκαν με διηθητικό χαρτί Whatman, τοποθετήθηκαν σε νέα Duran και αποστειρώθηκαν στους 121 °C για 20 min, με στόχο τη θανάτωση της ενδογενούς μικροχλωρίδας. Μετά την αποστείρωση, υπό ασηπτικές συνθήκες τα δείγματα διηθήθηκαν εκ νέου με αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί Whatman και 10 mL του εκάστοτε εκχυλίσματος τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα falcon και εμβολιάστηκαν με  $10^7$  CFU/mL του παθογόνου μικροοργανισμού (Manios *et al.*, 2013).

Έπειτα από τον εμβολιασμό, και στις δύο περιπτώσεις, τα δείγματα τοποθετούνταν στους 5 °C και στους 20 °C όπου παρέμεναν είτε για 2 h είτε για 2 ημέρες (48 h) μέχρι την έκθεση τους σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (acid challenge). Μετά την πάροδο της συντήρησης τους, γινόταν μια αρχική δειγματοληψία των φυτικών εκχυλισμάτων προκειμένου να εκτιμηθεί ο πληθυσμός του *Salmonella* πριν το acid challenge, μέτρηση του pH τους και φυγοκέντρηση στη θερμοκρασία συντήρησης τους, με στόχο τον καθαρισμό των δειγμάτων και την απομάκρυνση των μεταβολικών προϊόντων των λαχανικών. Μετά τη φυγοκέντρηση, το ίζημα που προέκυπτε επαναδιαλυόταν σε falcon που περιείχαν 19 mL προθερμασμένου στους 37 °C TSB pH 2.7 και ξεκινούσε η διαδικασία του acid challenge. Η όξινη καταπόνηση πραγματοποιούνταν στους 37 °C για συνολικό χρόνο έως 75 min, ενώ η καταμέτρηση του παθογόνου λάμβανε χώρα ανά 15 min με επίστρωση του παθογόνου σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ακολουθώντας την τεχνική διπλής στρώσης (TSA, XLD) για την καλύτερη ανάκτηση τραυματισμένων κυττάρων. Στη συνέχεια, τα τρυβλία τοποθετούνταν σε επωαστικό θάλαμο στους 37 °C και η καταμέτρηση των αποικιών γινόταν μετά από 24 h.

### **2.8.2 Επίδραση της παρουσίας διαφορετικών μέσων παραμονής του παθογόνου κατά τη διάρκεια έκθεσης του μικροοργανισμού *Salmonella* σε συνθήκες όξινης καταπόνησης.**

Έχοντας μελετήσει το πώς η παραμονή του παθογόνου σε διαφορετικά φυτικά εκχυλίσματα επηρεάζει τη μετέπειτα οξεοανθεκτικότητα του, γεννήθηκε το ερώτημα του τι ρόλο παίζει το μέσο παραμονής στην επιβίωση του μικροοργανισμού μετά από έκθεση

σε συνθήκες όξινης καταπόνησης. Υπάρχει διαφορά εάν ο μικροοργανισμός εμβολιαστεί απευθείας σε φυτικό ιστό συγκριτικά με το εάν εμβολιαστεί στο θεραπευτικό μέσο ανάπτυξης; Με βάση τα ερωτήματα αυτά, για τους ίδιους χρόνους και θερμοκρασίες συντήρησης, αντί για συντήρηση σε φυτικά εκχυλίσματα το παθογόνο συντηρήθηκε σε εργαστηριακό θρεπτικό υπόστρωμα και στη συνέχεια εκτέθηκε είτε σε TSB με χαμηλό pH είτε σε εκχυλίσματα αραιωμένα σε TSB με χαμηλό pH.

Πιο συγκεκριμένα, μετά την ανανέωση και τον καθαρισμό του εμβολίου, falcon με 10 mL αποστειρωμένο TSB εμβολιάστηκαν με  $10^6$  CFU/mL και συντηρήθηκαν στους 5 °C και στους 20 °C για διάστημα 2 h και 48 h έως την υποβολή σε όξινη καταπόνηση. Η συγκέντρωση του παθογόνου με την οποία εμβολιάστηκαν τα δείγματα επιλέχθηκε με βάση τον αντίστοιχο ολικό πληθυσμό του παθογόνου που παρατηρήθηκε στα ακέραια τμήματα του εκάστοτε λαχανικού κατά την υποβολή σε όξινη καταπόνηση. Αφού διενεργήθηκε αρχική δειγματοληψία και μετρήθηκε το αρχικό pH, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις θερμοκρασίες συντήρησης τους και αφού απορρίφθηκε το υπερκείμενο τους, το ίζημα που προέκυπτε επαναδιαλύονταν σε σακούλες φίλτρου που περιείχαν 19 mL πούλπας λαχανικού pH 2.7 προθερμασμένης στους 37 °C. Για τη δημιουργία της πούλπας, λαχανικά ξεπλύθηκαν, ομογενοποιήθηκαν με χρήση ομογενοποιητή χειρός (hand mixer) και πραγματοποιήθηκε αραιώση τους 1:10 με ήδη ρυθμισμένο TSB pH 2.7.

Η όξινη καταπόνηση πραγματοποιούνταν στους 37 °C για συνολικό χρόνο έως 75 min, ενώ η καταμέτρηση του παθογόνου λάμβανε χώρα ανά 15 min με επίστρωση του παθογόνου σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ακολουθώντας την τεχνική διπλής στρώσης (TSA, XLD) για την καλύτερη ανάκτηση τραυματισμένων κυττάρων. Στη συνέχεια, τα τρυβλία τοποθετούνταν σε επωαστικό θάλαμο στους 37 °C και η καταμέτρηση των αποικιών γινόταν στις 24 h.

Επιπλέον, ο παθογόνος μικροοργανισμός μετά τη 2<sup>η</sup> ανανέωση του και χωρίς συντήρηση (κύτταρα στατικής φάσης) εκτέθηκε σε συνθήκες χαμηλού pH με σκοπό να διερευνηθεί το κατά πόσο αλληλεπιδρά η συντήρηση των 2 h καθώς και των 48 h στη φυσιολογία του και στη μετέπειτα απόκριση του έναντι συνθηκών όξινης καταπόνησης.

Μελετώντας τη συμπεριφορά του παθογόνου μικροοργανισμού είτε σε ακέραια τμήματα λαχανικών είτε σε εκχυλίσματα τους και παρατηρώντας την επαγωγή οξειθανεκτικότητας σε ορισμένες περιπτώσεις, τέθηκε το ερώτημα ποιοι μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για την προσαρμογή του παθογόνου σε ακραίες συνθήκες; Σε αυτό το πλαίσιο μελετήθηκε η έκφραση γονιδίων που είναι γνωστό ότι σχετίζονται με την παθογένεια και τη λοιμωξιγόνο δράση του μικροοργανισμού καθώς και με μηχανισμούς προσαρμογής και αντιμετώπισης ακραίων όξινων συνθηκών.

## **2.9 Επίδραση της εποίκισης διαφορετικών λαχανικών στη μεταβολή των επιπέδων γονιδιακής μεταγραφής του *Salmonella* Enteritidis.**

Για τον προσδιορισμό των γονιδίων που σχετίζονται με την παθογένεια και τη λοιμωξιγόνο δράση του *Salmonella*, η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Real-Time RT-PCR (PCR πραγματικού χρόνου) η οποία είναι μια γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος, που επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων (Σχήμα 3). Στη Real-Time PCR, η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο φθορισμός μετριέται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος.

Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα).

Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολές. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους.

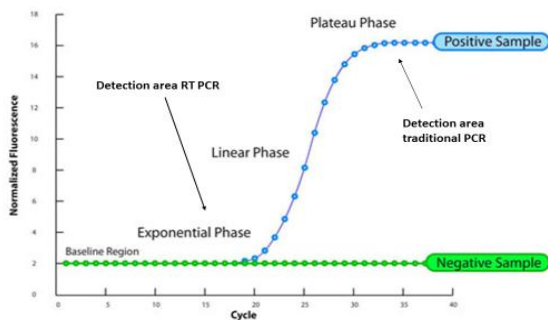
Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (Bustin *et al.*, 2005; Kubista *et al.*, 2006).



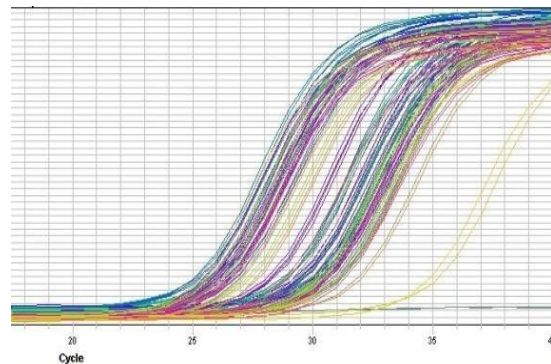
Απομόνωση RNA και παραλαβή cDNA με RT-PCR

Real-time PCR

Εμφάνιση φθορισμού



Ανάλυση αποτελεσμάτων



Αποτελέσματα

Σχήμα 3: Αρχή λειτουργίας της Real-Time PCR.

### 2.9.1 Απομόνωση ολικού RNA

Με σκοπό τη μελέτη της μεταβολής των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται είτε με απόκριση του παθογόνου έναντι καταπονήσεων, είτε με τη λοιμοξιογόνο δράση του παθογόνου *Salmonella* spp όταν έχει προσκολληθεί ή βρίσκεται στο εσωτερικό του φυτικού ιστού των υπό μελέτη λαχανικών, 9 mL λαμβάνονταν από το εκάστοτε δείγμα στο οποίο γινόταν προσθήκη 1/10 του όγκου RNA Stop solution (95 % v/v EtOH/ 5 % v/v phenol-water saturated). Στη συνέχεια, η βιομάζα συλλεγόταν με φυγοκέντρηση για 10 min στις 3600 rpm, απορριπτόταν το υπερκείμενο και τα βακτηριακά ιζήματα φυλάσσονταν στους -20 °C.



Η απομόνωση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο hot phenol/ SDS, όπως περιγράφεται από τους Jahn *et al.*, (2008), με μικρές τροποποιήσεις. Αρχικά προηγείται λύση των κυττάρων με προσθήκη 500  $\mu$ L διαλύματος λύσης (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 και 0.5 mg/mL λυσοζύμη). Στη συνέχεια, προστίθεται 50  $\mu$ L SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, 10 % w/v) και επώαση στους 65 °C για 3 min. Ακολούθως, προστίθεται 18  $\mu$ L CH<sub>3</sub>COONa (3M, pH 5.2) και 600  $\mu$ L προθερμασμένη όξινη φαινόλη και επωάζονται στους 65 °C για 6 min. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται άμεσα στον πάγο, όπου και παρέμειναν για 1-2 min. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 5 min. Έπειτα το υπερκείμενο μεταφερόταν σε νέο σωλήνα erpendorf και προστίθεντο μία συγκεκριμένη αναλογία φαινόλης: χλωροφορμίου: ισοαμυλική αλκοόλης (24:24:1), αναδεύονται και φυγοκεντρούνται στις 12000 rpm για 3 min. Επαναλαμβάνονται το προηγούμενο βήμα και ακολούθως το υπερκείμενο μεταφερόταν σε 1 V χλωροφορμίου: ισοαμυλική αλκοόλη (24:1 v/v) και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 3 min. Η κατακρήμνιση του RNA πραγματοποιούνταν με την προσθήκη 2.5 V αιθανόλης (100%) και 1/10 V CH<sub>3</sub>COONa (3 M, pH 5.2) και ακόλουθη τοποθέτηση στους -80 °C O/N(over night). Η παραλαβή των νουκλεϊνικών οξέων γινόταν με φυγοκέντρηση στους 4 °C, στις 13000 rpm για 30 min, καθαρισμό με 500  $\mu$ L αιθανόλη 70% v/v και φυγοκέντρηση στους 4 °C, στις 12000 rpm για 5 min. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απομακρυνόταν και τα ιζήματα αφήνονταν να στεγνώσουν για περίπου 20 min. Το RNA επαναδιαλυόταν σε 25  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O και φυλασσόταν στους -80 °C. Η συγκέντρωση του RNA προσδιοριζόταν φωτομετρικά (Implen, NanoPhotometer) με μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm. Η καθαρότητα των νουκλεϊνικών οξέων προσδιοριζόταν από το λόγο A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub>.

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

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

### 2.9.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time PCR)

Η Real time PCR πραγματοποιήθηκε στη συσκευή StepOne Plus (Applied Biosystems). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τα υπό μελέτη γονίδια, προέκυψαν μετά από βιβλιογραφική αναζήτηση και φαίνονται στον Πίνακα 2. Η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης PCR (PCR efficiency, E) για κάθε ζεύγος εκκινητών προσδιορίστηκε βάσει της εξίσωσης  $E=10^{-1/\text{slope}}$  (Pfaffl 2004), χρησιμοποιώντας διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις cDNA. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνταν σε όγκο 10μl, χρησιμοποιώντας 1μl cDNA ως μήτρα, 2X KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X)ABI Prism™ (Kapa Biosystems) και τους εξειδικευμένους για κάθε γονίδιο εκκινητές σε τελική συγκέντρωση 0,2μmol. Για όλα τα γονίδια ακολουθήθηκε τα παρακάτω θερμοκρασιακό πρόγραμμα: 95°C για 1min, 40 κύκλοι 95°C για 3sec, 55°C για 30sec, 72°C για 30sec, ενώ ακολουθούσε ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης (Melting Curve Analysis) ως εξής: 95°C για 15sec, 60°C για 1min και 95 °C (ρυθμό αύξησης θερμοκρασίας 0.3 °C sec<sup>-1</sup> για 15 sec). Για κάθε γονίδιο, περιλαμβανόταν θετικός και αρνητικός μάρτυρας.

Τα επίπεδα έκφρασης των διαφορετικών γονιδίων κανονικοποιήθηκαν ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς *16SrRNA*, ως καθολικά εκφραζόμενο γονίδιο (reference gene). Ο προσδιορισμός των επιπέδων σχετικής έκφρασης υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο του Pfaffl (2001), η οποία λαμβάνει υπ' όψη τις διαφορετικές αποδόσεις PCR (PCR Efficiencies) των υπό μελέτη γονιδίων. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν για κάθε περίπτωση είναι ο μέσος όρος τριών βιολογικών επαναλήψεων, ενώ διενεργήθηκαν και τεχνικές επαναλήψεις (technical replicates), επιλεκτικά, για κάποια δείγματα. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται αναλυτικά τα γονίδια στόχοι που μελετήθηκαν και η

λειτουργία τους (Πίνακας 2.2) καθώς και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη (Πίνακας 2.3).

**Πίνακας 2.2:** Τα γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη και η λειτουργία τους.

<b>Γονίδιο</b>	<b>Λειτουργία</b>	
<i>spvR</i>	Παθογένεια	Virulence plasmid
<i>hilA</i>	Παθογένεια	
<i>invA</i>	Παθογένεια	SPI-I/ T3SS
<i>prgH</i>	προσκόλληση σε βιοτικές επιφάνειες	
<i>avrA</i>	Παθογένεια	SPI-2/ T3SS
<i>ssrB</i>	Ρυθμιστής	
<i>proV</i>	προσαρμογή σε συνθήκες <i>ωσμωτικής</i> καταπόνησης	
<i>cadB</i>	προσαρμογή σε συνθήκες <i>όξινης</i> καταπόνησης	

**Πίνακας 2.3:** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Γονίδιο στόχος	Ορθός εκκινητής (5'→3')	Ανάστροφος εκκινητής (3'→5')	Μήκος προϊόντος (bp)	Απόδοση PCR	Πηγή
<i>RpoS</i>	GAATCTGACGAACACGCTCA	CCACGCAAGATGACGATATG	171	1.93	Yang et al., 2014
<i>spvR</i>	GAGAGCCGTTAACAGCCAAA	ATATCAGGTTTGCCGCAGAG	171	2.0	Yang et al., 2014
<i>hilA</i>	ATTAAGGCGACAGAGCTGGA	GCAGAAAATGGGCGAAAAGTAA	134	1.91	Yang et al., 2014
<i>avrA</i>	GAGCTGCTTTGGTCCTCAAC	AATGGAAGGCGTTGAATCTG	173	1.93	Yang et al., 2014
<i>16SrRNA</i>	CAGAAGAAGCACCGGCTAAC	GACTCAAGCCTGCCAGTTTC	167	1.92	Yang et al., 2014
<i>invA</i>	CAACGTTTCCTGCGGTACTGT	CCCGAACGTGGCGATAATT	116	1.95	Gonzales-Escalona et al, 2009
<i>ssrB</i>	GCGTTGGCCAGCAATGAATA	TTGCAATGCCGCTAACAGAA	136	1.93	Tomjenovic-Berube PhD thesis, 2012
<i>prgH</i>	GCTCTTCTTGCTCATCGT	ATCTCTATCTGGCTGGATACCT	121	1.92	Brunelle et al., 2013
<i>proV</i>	CCACAATGGTACGCCTTCTCA	GCATGAGCGCAAATGACTGGA	153	1.9	Finn et al., 2013
<i>cadB</i>	TCCAGACCGGCGTTCTTTAT	ATGCCGGGAAGAACGTAGAA	96	1.95	Alvarez-Oldorez et al., 2010

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 3.1 Εκτίμηση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας των λαχανικών

Η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX) των πέντε λαχανικών (σπανάκι, μαρούλι, βλίτα, ιταλικά χόρτα, ρόκα) εκτιμήθηκε κατά την ημέρα παραλαβής τους καθώς και ύστερα από 48 h συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασία 5 °C και 20 °C. Κατά την ημέρα παραλαβής τους, η OMX των λαχανικών κυμαινόταν από 5.4 έως 6.8 log CFU/g ενώ μετά από 48 h σημειώθηκε αύξηση του πληθυσμού τόσο στους 5 °C όσο και στους 20 °C. Ωστόσο, μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στη θερμοκρασία των 20 °C (έως και 2 log CFU/g). Το pH των λαχανικών κατά την ημέρα παραλαβής τους κυμαινόταν από 5.8 έως 6.4 ενώ μικρές μεταβολές παρατηρήθηκαν μετά από 48 h τόσο σε θερμοκρασία 5 °C (pH 5.9 έως 6.2) όσο και σε θερμοκρασία 20 °C (pH 6 έως 6.3) (Πίνακας 3.1).

**Πίνακας 3.1:** pH ανεμβολίαστων λαχανικών μετά από 2 h και μετά από 48 h συντήρησης στους 5 °C και στους 20 °C.

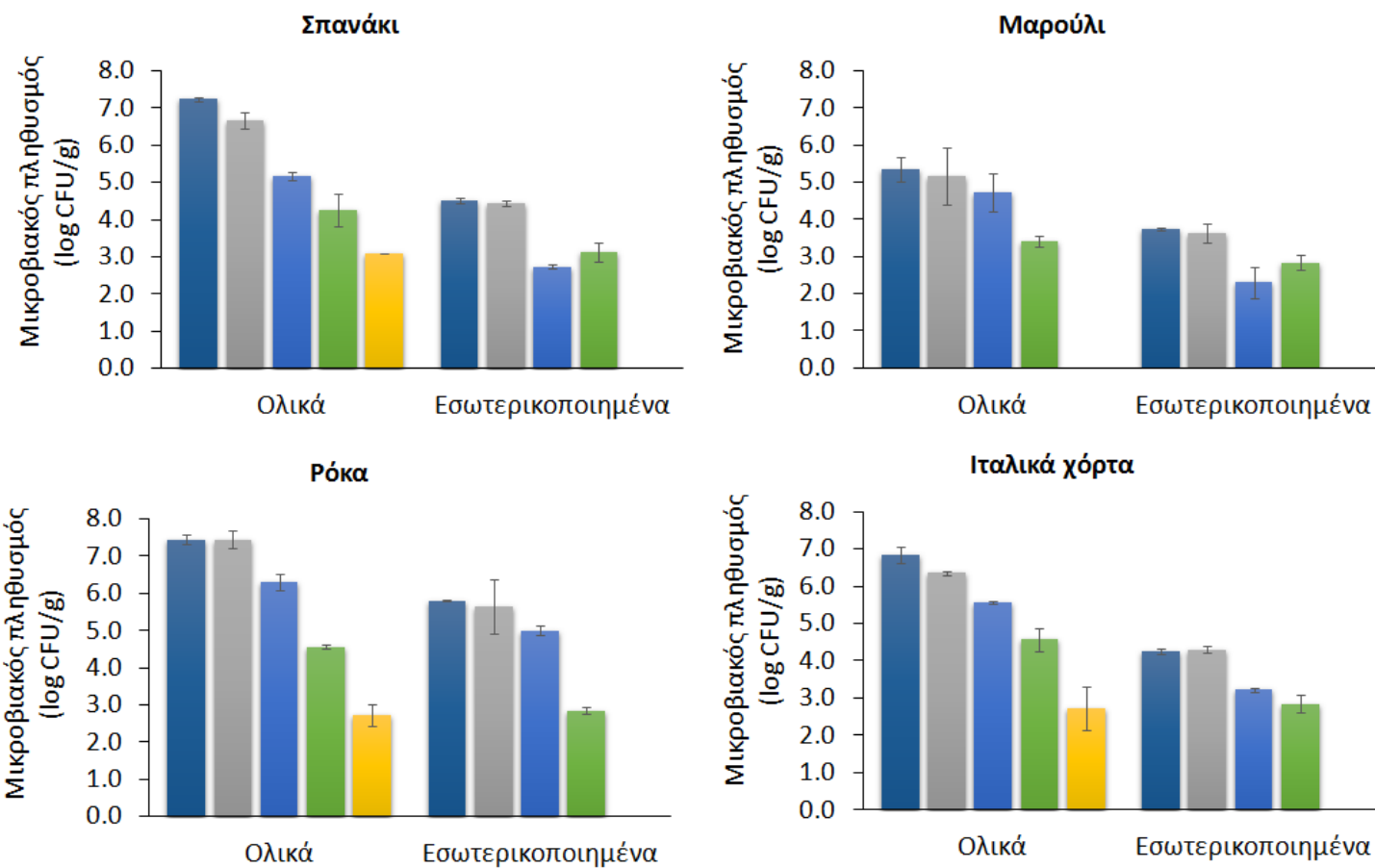
Λαχανικά	2 h	48 h	
		5 °C	20 °C
<b>Σπανάκι</b>	6.2±0.1	6.2±0.0	6.3±0.2
<b>Μαρούλι</b>	5.8±0.0	6.0±0.0	6.0±0.1
<b>Βλίτα</b>	6.4±0.0	6.2±0.1	6.0±0.2
<b>Ρόκα</b>	6.1±0.0	5.9±0.2	6.3±0.1
<b>Ιταλικά χόρτα</b>	6.2±0.0	6.0±0.3	6.2±0.1

Προκειμένου να εκτιμηθούν τα επίπεδα των μικροβιακών πληθυσμών (OMX, ψευδομονάδες, μύκητες/ζύμες, εντεροβακτήρια και οξυγαλακτικά βακτήρια) που απαντώνται στα λαχανικά κατά την ημέρα παραλαβής τους, καθώς και το τι ποσοστό

αυτών αποτελεί τον εσωτερικοποιημένο πληθυσμό, έγινε δειγματοληψία των λαχανικών (σπανάκι, μαρούλι, ρόκα και ιταλικά χόρτα) και επίστρωση ή ενσωμάτωση τους (ανάλογα με το θρεπτικό υπόστρωμα) σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα.

Σύμφωνα με το Γράφημα, σε ότι αφορά τον πληθυσμό των ολικών κυττάρων καταμετρήθηκαν και τα πέντε είδη των μικροοργανισμών με εξαίρεση στο μαρούλι όπου δεν καταμετρήθηκαν οξυγαλακτικά βακτήρια. Η OMX για το σπανάκι, τη ρόκα και τα ιταλικά χόρτα ανερχόταν στους 7 log CFU/g ενώ στο μαρούλι στους 5.5 log CFU/g, και οι ψευδομονάδες αποτελούσαν τον κυρίαρχο μικροοργανισμό ανεξαρτήτως λαχανικού. Πιο συγκεκριμένα, ο πληθυσμός των ψευδομονάδων κυμαινόταν από 6.5 έως 7 log CFU/g ενώ στο μαρούλι ο πληθυσμός τους ήταν περίπου 5 log CFU/g. Ο πληθυσμός των μυκήτων/ζυμών κυμαινόταν από 5 έως 6 log CFU/g, των εντεροβακτηρίων ανερχόταν στους 4.5 log CFU/g και των οξυγαλακτικών βακτηρίων στους 3 log CFU/g. Η καταμέτρηση των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων στα λαχανικά ήταν αναμενόμενη καθώς σύμφωνα με τον Lund, (1992) αποτελούν την κυρίαρχη ομάδα μικροοργανισμών των φύλλων, με το μεγαλύτερο ποσοστό να είναι βακτήρια των οικογενειών *Enterobacteriaceae* και *Pseudomonadaceae*, ενώ ακολουθούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια, οι ζύμες και οι μύκητες (Brocklehurst *et al.*, 1987; Nguyen and Carlin, 1994; Sagoo *et al.*, 2003).

Σε ότι αφορά τον εσωτερικοποιημένο πληθυσμό των μικροοργανισμών, οξυγαλακτικά βακτήρια δεν εντοπίστηκαν σε κανένα από τα τέσσερα λαχανικά, ενώ ο πληθυσμός των εσωτερικοποιημένων μικροοργανισμών ήταν μικρότερος από τον αντίστοιχο ολικό πληθυσμό. Συγκεκριμένα, ο πληθυσμός της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας, των ψευδομονάδων και των εντεροβακτηρίων που εσωτερικοποιήθηκαν ήταν κατά 1 με 2 log CFU/g μικρότερος σε σύγκριση με τον αντίστοιχο ολικό πληθυσμό, ενώ σε ότι αφορά τους μύκητες/ζύμες, ο πληθυσμός ήταν μειωμένος κατά 2 με 3 log CFU/g σε σύγκριση με τον αντίστοιχο ολικό σε όλα τα λαχανικά.



**Γράφημα 3.1:** Διαγραμματική απεικόνιση του ολικού και εσωτερικοποιημένου πληθυσμού (log CFU/g) των μικροοργανισμών που απαντώνται στα λαχανικά (σπανάκι, μαρούλι, ρόκα, ιταλικά χόρτα). Τα επίπεδα των διαφορετικών μικροοργανισμών που εντοπίστηκαν στα λαχανικά επισημαίνονται με διαφορετικό χρώμα: ολική μεσόφιλη χλωρίδα (μπλε), ψευδομονάδες (γκρι), μύκητες/ζύμες (γαλάζιο), εντεροβακτήρια (πράσινο) και οξυγαλακτικά βακτήρια (κίτρινο), ενώ οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση μεταξύ των επαναλήψεων (n=2).

### 3.2 Βαθμός προσκόλλησης και εσωτερικοποίησης του *S. Enteritidis* σε φυλλώδη λαχανικά

Για τη μελέτη της ικανότητας προσκόλλησης και εσωτερικοποίησης του παθογόνου *S. Enteritidis* σε φυλλώδη λαχανικά σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου χρησιμοποιήθηκαν μαρούλι, βλίτα και σπανάκι, τα οποία εμβολιάστηκαν με τη μέθοδο της εμβάπτισης με χρήση εμβολίου συγκέντρωσης  $7 \log \text{CFU/mL}$ . Στη συνέχεια συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασία  $5^\circ\text{C}$  και  $20^\circ\text{C}$  για 2 h και 48 h. Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η ικανότητα προσκόλλησης και εσωτερικοποίησης του παθογόνου σε διαφορετικά λαχανικά, στην παρούσα μελέτη διεξήχθησαν πειράματα σε ιταλικά χόρτα και ρόκα.

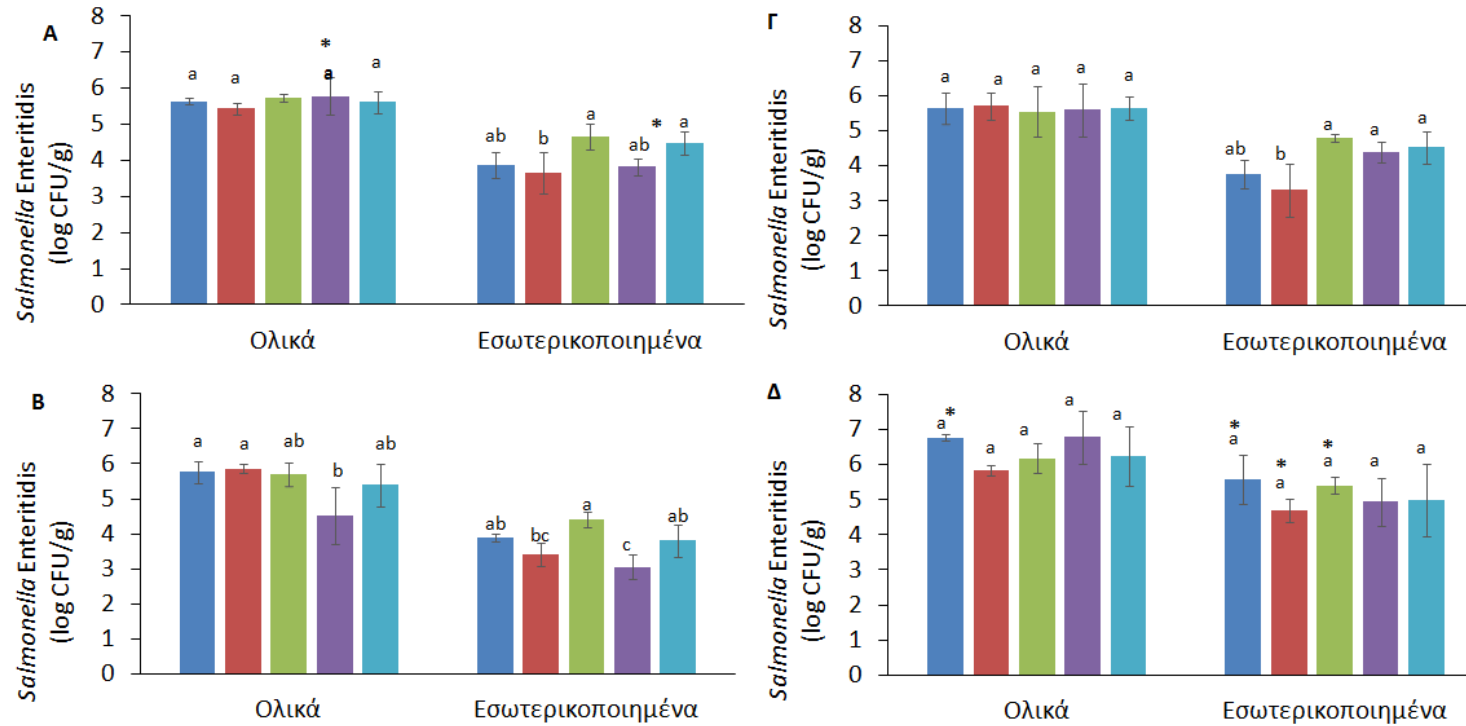
Συντήρηση των εμβολιασμένων λαχανικών για 2 h σε θερμοκρασίες  $5^\circ\text{C}$  και  $20^\circ\text{C}$ , όπως φαίνεται στο Γράφημα 3.2 είχε ως αποτέλεσμα την ανάκτηση παρόμοιου πληθυσμού ολικών κυττάρων του *S. Enteritidis* στα λαχανικά ( $P>0.05$ ). Συγκεκριμένα, ο πληθυσμός τους κυμαινόταν από 5 έως  $6 \log \text{CFU/g}$ , ανεξαρτήτως του είδους του λαχανικού και της θερμοκρασίας συντήρησης. Σε ότι αφορά τον πληθυσμό των εσωτερικοποιημένων κυττάρων, κυμαινόταν από 4 έως  $5 \log \text{CFU/g}$  και εξαρτιόταν από το είδος του λαχανικού καθώς και από τις συνθήκες συντήρησης τους. Η επίδραση του είδους του λαχανικού στο βαθμό εσωτερικοποίησης του *Salmonella* spp. επιβεβαιώνεται και από έρευνες των Klercks *et al.* (2004), που δείχνουν διαφορετική αλληλεπίδραση μεταξύ των εμπορικά διαθέσιμων ποικιλιών μαρουλιού και της επιβίωσης των οροτύπων *S. enterica*, καθώς οι ορότυποι *S. enterica* ήταν ικανοί να εποικίζουν το μαρούλι επιφυτικά αλλά μόνο η *S. enterica* serovar Dublin ήταν ικανή να εποικίζει τα φυτά και ενδοφυτικά. Επίσης, σύμφωνα με τους Krupitski *et al.*, (2009) παρατηρήθηκε διαφορετικός βαθμός εσωτερικοποίησης στα διάφορα είδη λαχανικών.

Στην παρούσα μελέτη, συντήρηση των εμβολιασμένων λαχανικών για 2 h σε χαμηλή θερμοκρασία είχε ως αποτέλεσμα την εσωτερικοποίηση  $5 \log \text{CFU/g}$  του παθογόνου σε σπανάκι και ιταλικά χόρτα ενώ στα υπόλοιπα λαχανικά ο πληθυσμός του παθογόνου κυμαινόταν από 3.5 έως  $4 \log \text{CFU/g}$  ( $P<0.05$ ). Αντίθετα, παραμονή του παθογόνου στους  $20^\circ\text{C}$  είχε ως αποτέλεσμα παρόμοιο βαθμό εσωτερικοποίησης



για όλα τα λαχανικά (4.5-5 log CFU/g). Κατά τη συντήρηση των λαχανικών για 48 h στους 5 °C δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μεταβολή ( $P>0.05$ ) στον πληθυσμό του παθογόνου στα υπό μελέτη λαχανικά, με εξαίρεση τη ρόκα η οποία παρουσίασε το μικρότερο βαθμό εσωτερικοποίησης (3.5 log CFU/g) σε σύγκριση με τα υπόλοιπα λαχανικά. Ενδεχομένως, αυτό να οφείλεται είτε στο γεγονός ότι στους 5 °C η ρόκα ήταν το λαχανικό στο οποίο παρατηρήθηκε το χαμηλότερο pH (5.9) γεγονός το οποίο να μην επέτρεψε στα κύτταρα του παθογόνου να εσωτερικοποιηθούν σε μεγάλο βαθμό είτε στο ότι κατά την εκτίμηση της OMX, ο εσωτερικοποιημένος πληθυσμός που καταμετρήθηκε (περίπου 6 log CFU/g) ήταν μεγαλύτερος σε σχέση με τα υπόλοιπα λαχανικά οπότε ίσως να υπήρξε μεγαλύτερος ανταγωνισμός με τη φυσική μικροχλωρίδα. Παρόλα αυτά σε έρευνες των Kroupitski *et al.*, (2009) και Goldberg *et al.*, (2011), σε παρατήρηση του φαινομένου της εσωτερικοποίησης μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας, η ρόκα ήταν το δεύτερο λαχανικό (μετά το μαρούλι) με τη μεγαλύτερη ικανότητα εσωτερικοποίησης του παθογόνου. Παρατεταμένη συντήρηση του παθογόνου στους 20 °C είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του εσωτερικοποιημένου πληθυσμού του παθογόνου στο σπανάκι και στα βλίτα, ενώ ο αντίστοιχος ολικός πληθυσμός παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητος, γεγονός που πιθανώς αποδίδεται είτε στην αύξηση του ήδη εσωτερικοποιημένου πληθυσμού, είτε στην αύξηση του φαινομένου της εσωτερικοποίησης.

Με βάση την ικανότητα εσωτερικοποίησης του *S. Enteritidis* τα λαχανικά κατατάσσονται ως εξής: σπανάκι> ιταλικά χόρτα> μαρούλι> βλίτα >ρόκα. Ο σχετικά μεγάλος βαθμός εσωτερικοποίησης που παρουσιάστηκε στο μαρούλι ήταν αναμενόμενος καθώς στα πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας των Kroupitski *et al.*, (2009) και Goldberg *et al.*, (2011), το μαρούλι παρουσίασε το μεγαλύτερο βαθμό εσωτερικοποίησης σε σύγκριση με άλλα λαχανικά.

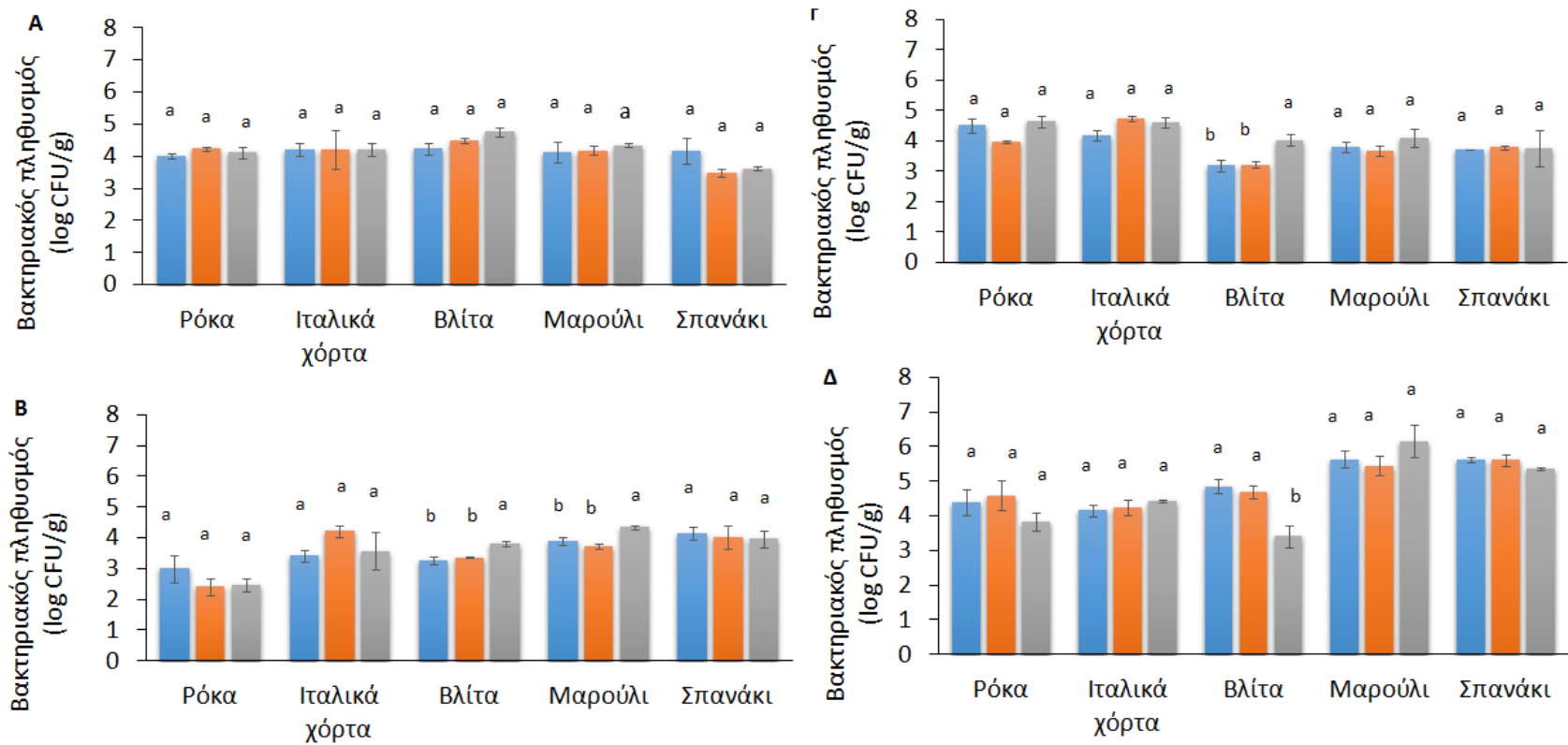


**Γράφημα 3.2** Διαγραμματική απεικόνιση του ολικού και εσωτερικοποιημένου πληθυσμού (log CFU/g) *S. Enteritidis* σε μαρούλι (μπλε), βλίτα (κόκκινο), σπανάκι (πράσινο), ρόκα (μωβ) και ιταλικά χόρτα (γαλάζιο) μετά από συντήρηση στους 5 °C για 2 h (A) ή 48 h (B) και στους 20 °C για 2 h (Γ) ή 48 h (Δ). Η στατιστική ανάλυση εντός των ίδιων πληθυσμών απεικονίζονται με γράμματα, όπου οι περιπτώσεις που δεν έχουν κοινό κάποιο γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0.05$ ) ενώ οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση μεταξύ των επαναλήψεων ( $n=4$ ). Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές όμοιων πληθυσμών σε κάθε λαχανικό μεταξύ των χρόνων συντήρησης.

### **3.3 Ικανότητα προσκόλλησης και εσωτερικοποίησης διαφορετικών στελεχών *Salmonella* σε φυλλώδη λαχανικά**

Είναι γνωστό ότι διαφορετικοί ορότυποι του παθογόνου *Salmonella* χαρακτηρίζονται από παραλλακτικότητα ως προς την ικανότητα προσκόλλησης, το σχηματισμό βιουμενίων σε βιοτικές και αβιοτικές επιφάνειες καθώς και στην ικανότητα εσωτερικοποίησης τους (Guo *et al.*, 2002; Barak *et al.*, 2005; Gibson *et al.*, 2006; Barak *et al.*, 2007; Lapidot and Yaron, 2009). Επιπλέον, οι μηχανισμοί προσκόλλησης διαφέρουν μεταξύ των ορότυπων (Barak *et al.*, 2005; Gibson *et al.*, 2006; Barak *et al.*, 2007; Lapidot and Yaron, 2009) και ο ρόλος των μαστιγίων στην προσκόλληση του παθογόνου μικροοργανισμού στα φύλλα δείχνει ότι διαφορετικοί ορότυποι χρησιμοποιούν ειδικούς μηχανισμούς για να προσκολληθούν σε διαφορετικά λαχανικά όπως μαρούλι, σπανάκι, ρόκα (Berger *et al.*, 2009).

Οι Berger *et al.* (2009) ανέφεραν ότι οι ορότυποι *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* και *S. Seftenberg* προσκολλώνται αποτελεσματικότερα σε φυλλώδη λαχανικά σε σχέση με άλλους ορότυπους (*S. Arizona*, *S. Heidelberg*, *S. Agona*). Στην έρευνα του Χιλιάι (2015) επιλέχθηκαν τρία στελέχη *Salmonella* και εμβολιάστηκαν με τη μέθοδο της εμβάπτισης ( $7 \log \text{CFU/mL}$ ) σε δύο λαχανικά. Συγκεκριμένα οι ορότυποι που επιλέχθηκαν ήταν ο *S. Typhimurium*, ο *S. Infantis* και ο *S. Enteritidis* οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό των βλίτων και του μαρουλιού όπως περιγράφεται παραπάνω ενώ ακολούθησε συντήρηση των λαχανικών σε θερμοκρασία 5 °C και 20 °C για 2 h και 48 h. Ως συνέχεια του πειράματος αυτού, στην παρούσα μελέτη, η ίδια διαδικασία εφαρμόστηκε και στο σπανάκι, στα ιταλικά χόρτα και στη ρόκα. Ο λόγος επιλογής πέντε διαφορετικών λαχανικών ήταν η μελέτη της ενδεχόμενης παραλλακτικότητας των στελεχών ως προς την ικανότητα προσκόλλησης και εσωτερικοποίησης τους σε διαφορετικά λαχανικά. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στο Γράφημα 3.3.



**Γράφημα 3.3** Διαγραμματική απεικόνιση του εσωτερικοποιημένου πληθυσμού (log CFU/g) του *S. Enteritidis* (μπλε), *S. Infantis* (κόκκινο) και *S. Typhimurium* (πράσινο) σε ρόκα, ιταλικά χόρτα, βλίτα, μαρούλι και σπανάκι μετά από συντήρηση στους 5 °C για 2 h (Α) ή 48 h (Β) και στους 20 °C για 2 h (Γ) ή 48 h (Δ). Η στατιστική ανάλυση εντός των ίδιων πληθυσμών απεικονίζεται με γράμματα, όπου οι περιπτώσεις που δεν έχουν κοινό κάποιο γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0.05$ ) ενώ οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση μεταξύ των επαναλήψεων ( $n=4$ ).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η συντήρηση των λαχανικών για 2 h στους 5 °C είχε ως αποτέλεσμα ο εσωτερικοποιημένος πληθυσμός και για τα τρία στελέχη να ανέρχεται στους 4.0-4.5 log CFU/g ενώ στους 20 °C να είναι περίπου 3.5-4.5 log CFU/g. Στατιστικώς σημαντικές διαφορές δεν παρατηρήθηκαν μεταξύ των διαφορετικών οροτύπων ( $P>0.05$ ), παρά μόνο στην περίπτωση των βλίτων στους 20 °C όπου οι ορότυποι *S. Enteritidis* και *S. Infantis* διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από τον ορότυπο *S. Typhimurium* ( $P<0.05$ ). Σε μελέτη των Miryam Díez-García *et al.*, (2012), αναφέρεται ότι ο ορότυπος *S. Typhimurium* είχε μεγαλύτερη ικανότητα σχηματισμού βιουμενίων σε σχέση με τους άλλους ορότυπους, γεγονός το οποίο ίσως εξηγεί και την καλύτερη ικανότητα εσωτερικοποίησης του.

Περαιτέρω παραμονή των λαχανικών στους 5 °C για 48 h είχε ως αποτέλεσμα μια μείωση της τάξεως του 1.0-1.5 log CFU/g του εσωτερικοποιημένου πληθυσμού, η οποία στην περίπτωση των βλίτων και στο μαρούλι είναι στατιστικώς σημαντική ( $P<0.05$ ) για τους ορότυπους *S. Enteritidis* και *S. Infantis*. Αντίθετα, η παραμονή των λαχανικών στους 20 °C για 48 h οδήγησε σε μικρή αύξηση του εσωτερικοποιημένου πληθυσμού με στατιστικώς σημαντικές διαφορές να παρατηρούνται μόνο στην περίπτωση των βλίτων καθώς ο πληθυσμός των οροτύπων *S. Enteritidis* και *S. Infantis* αυξήθηκε κατά 1.0 log CFU/g ενώ ο πληθυσμός του οροτύπου *S. Typhimurium* μειώθηκε κατά 1.0 log CFU/g. Σε μελέτη των Lianou και Koutsoumanis, (2012) αναφέρεται ότι η επίδραση των περιβαλλοντικών συνθηκών επιδρά στην ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων των στελεχών του *S. enterica* με αποτέλεσμα σε υψηλότερες θερμοκρασίες (25 °C) να αυξάνεται και η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων σε σχέση με άλλες χαμηλότερες. Ενδεχομένως, κάτι αντίστοιχο να συμβαίνει και με το βαθμό εσωτερικοποίησης του παθογόνου όπου είναι σχετικά υψηλότερος στη θερμοκρασία των 20 °C.

### **3.4 Έκθεση του *S. Enteritidis* σε συνθήκες όξινης καταπόνησης**

Με στόχο τη μελέτη της φυσιολογίας του παθογόνου μικροοργανισμού *S. Enteritidis* κατά την εποίκιση της επιφάνειας ή του εσωτερικού φυλλωδών λαχανικών, ο παθογόνος εκτέθηκε σε ακραία όξινη καταπόνηση προσομοιάζοντας το

περιβάλλον (pH) του στομάχου. Για το λόγο αυτό, η όξινη καταπόνηση πραγματοποιήθηκε στους 37 °C σε εργαστηριακό θρεπτικό υλικό TSB του οποίου το pH ρυθμίστηκε 2.7 υπό ασηπτικές συνθήκες με χρήση HCl (6N).

### 3.4.1 Απόκριση των ολικών, προσκολλημένων και εσωτερικοποιημένων σε λαχανικά κυττάρων του *Salmonella* Enteritidis έναντι ακόλουθης όξινης καταπόνησης

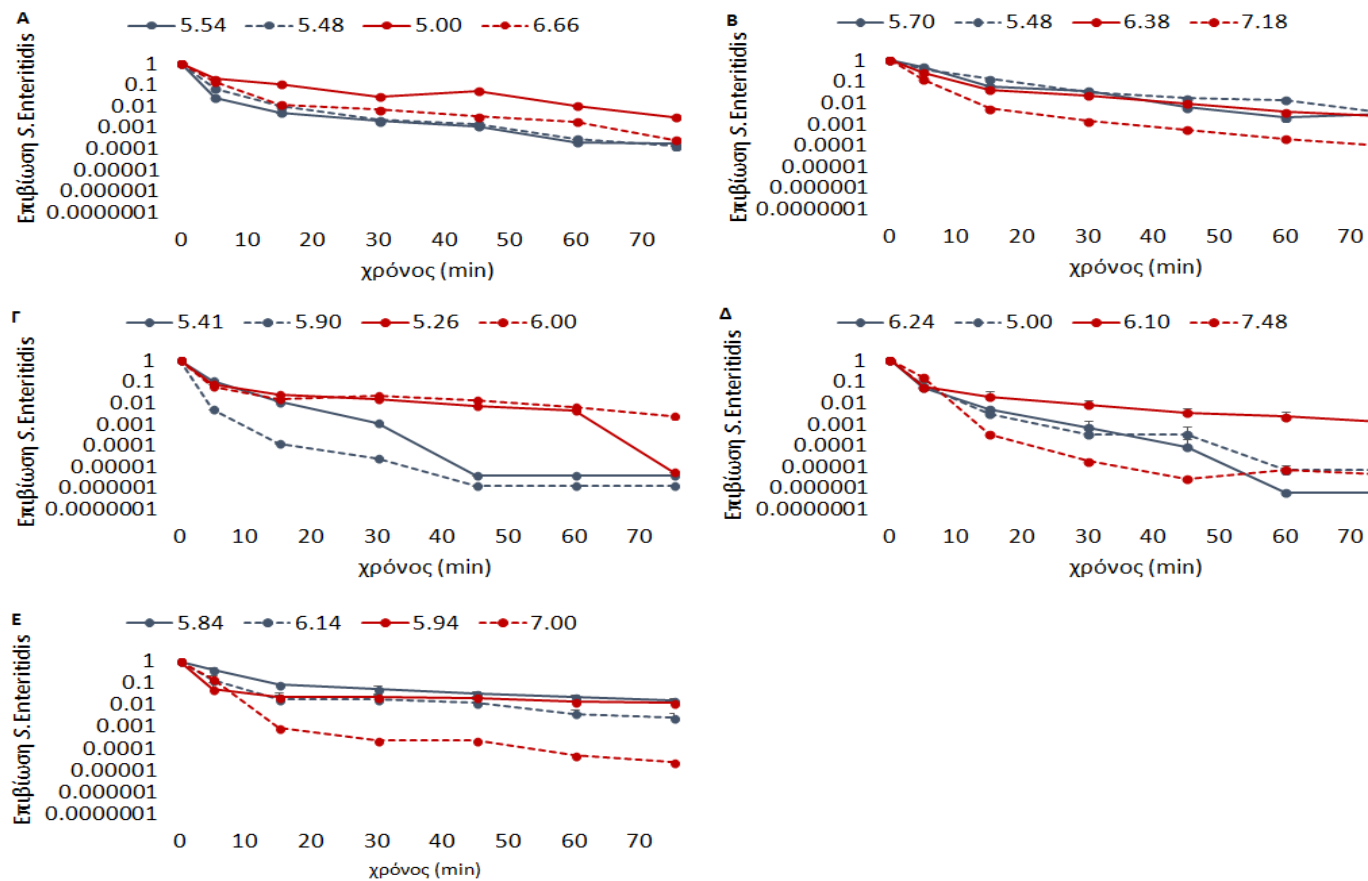
Με σκοπό τη μελέτη της φυσιολογίας των προσκολλημένων και των εσωτερικοποιημένων κυττάρων του *S. Enteritidis* μετά από παραμονή στο εκάστοτε λαχανικό για 2 h ή 48 h σε θερμοκρασία 5 °C και 20 °C, τα κύτταρα υποβάλλονταν σε όξινη καταπόνηση. Ο παθογόνος επιλέχθηκε να εκθέτεται σε pH 2.7, καθώς σε προπειράματα (Χιλαΐ, 2015), παρατηρήθηκε ομαλότερη μείωση του πληθυσμού κατά την έκθεση των πλαγκτονικών κυττάρων καθιστώντας έτσι πιο διακριτές τις πιθανές διαφορές στην απόκριση του παθογόνου. Οι αρχικοί πληθυσμοί των ολικών, προσκολλημένων και εσωτερικοποιημένων κυττάρων *S. Enteritidis* στο σπανάκι, στο μαρούλι, στα βλίτα, στη ρόκα και στα ιταλικά χόρτα που υποβλήθηκαν σε όξινη καταπόνηση παρατίθενται στον Πίνακα 3.2.

**Πίνακας 2.2** Αρχικοί πληθυσμοί (log CFU/g) ολικών, προσκολλημένων και εσωτερικοποιημένων κυττάρων σε σπανάκι, μαρούλι, βλίτα, ρόκα και ιταλικά χόρτα.

		<i>S. Enteritidis</i> (log CFU/g)					
		Ολικά		Προσκολλημένα		Εσωτερικοποιημένα	
Λαχανικό	T (°C) Χρόνος συντήρησης	5°C	20°C	5°C	20°C	5°C	20°C
Σπανάκι	2 h	5.7±0.0	6.4±0.0	4.2±0.0	4.8±0.2	4.6±0.5	4.8±0.1
	48 h	5.5±0.0	7.2±0.0	4.5±0.5	4.5±0.2	4.6±0.0	6.1±0.0
Μαρούλι	2 h	5.5±0.0	5.0±0.0	3.7±0.1	3.9±0.3	3.6±0.5	3.9±0.1
	48 h	5.5±0.0	6.7±0.0	4.2±0.4	5.9±0.0	3.9±0.0	4.9±0.7
Βλίτα	2 h	5.4±0.0	5.3±0.0	4.2±0.2	3.9±0.0	3.7±0.4	3.9±0.1
	48 h	5.9±0.0	6.0±0.0	3.9±0.5	4.1±0.2	3.7±0.5	4.5±0.4
Ρόκα	2 h	6.2±0.0	6.2±0.2	4.1±0.1	3.6±0.2	3.7±0.1	4.0±0.4
	48 h	5.2±0.3	7.4±0.1	2.9±0.0	5.4±0.1	3.1±0.4	5.5±0.1
Ιταλικά χόρτα	2 h	5.8±0.1	6.0±0.0	4.1±0.0	4.0±0.1	4.7±0.0	4.9±0.3
	48 h	5.9±0.4	7.0±0.0	3.9±0.1	5.2±0.1	4.2±0.0	5.8±0.6

Συγκεντρωτικά, τα αποτελέσματα που αφορούν τον ολικό, τον προσκολλημένο και τον εσωτερικοποιημένο πληθυσμό του παθογόνου στα λαχανικά φαίνονται στα παρακάτω Γραφήματα, στα οποία η επιβίωση ενός πληθυσμού εκφράζεται ως ο λόγος των επιβιωσάντων κυττάρων σε κάθε χρονική στιγμή ( $t_x$ ) προς τον αρχικό πληθυσμό  $t_0$ . Ο λόγος για τον οποίον οι πληθυσμοί του παθογόνου εκφράστηκαν με τη μορφή των επιβιωσάντων κυττάρων οφείλεται στο γεγονός ότι κάθε πληθυσμός κυττάρων ξεκινούσε από διαφορετικά επίπεδα πληθυσμού οπότε υπήρχαν δυσκολίες στη σύγκριση των αποτελεσμάτων.

Παρατηρώντας το Γράφημα 3.4, διαπιστώνεται ότι η θερμοκρασία και ο χρόνος συντήρησης δεν επηρεάζουν την οξεοανθεκτικότητα του παθογόνου στο μαρούλι και στο σπανάκι, ενώ χαμηλές θερμοκρασίες φαίνεται να ευαισθητοποιούν τα κύτταρα του παθογόνου στην περίπτωση των βλίτων. Από την άλλη πλευρά, ευαισθητοποίηση του πληθυσμού του *Salmonella* στη ρόκα και τα ιταλικά χόρτα παρατηρήθηκε κατά τη συντήρηση στη θερμοκρασία των 20 °C για 48 h.

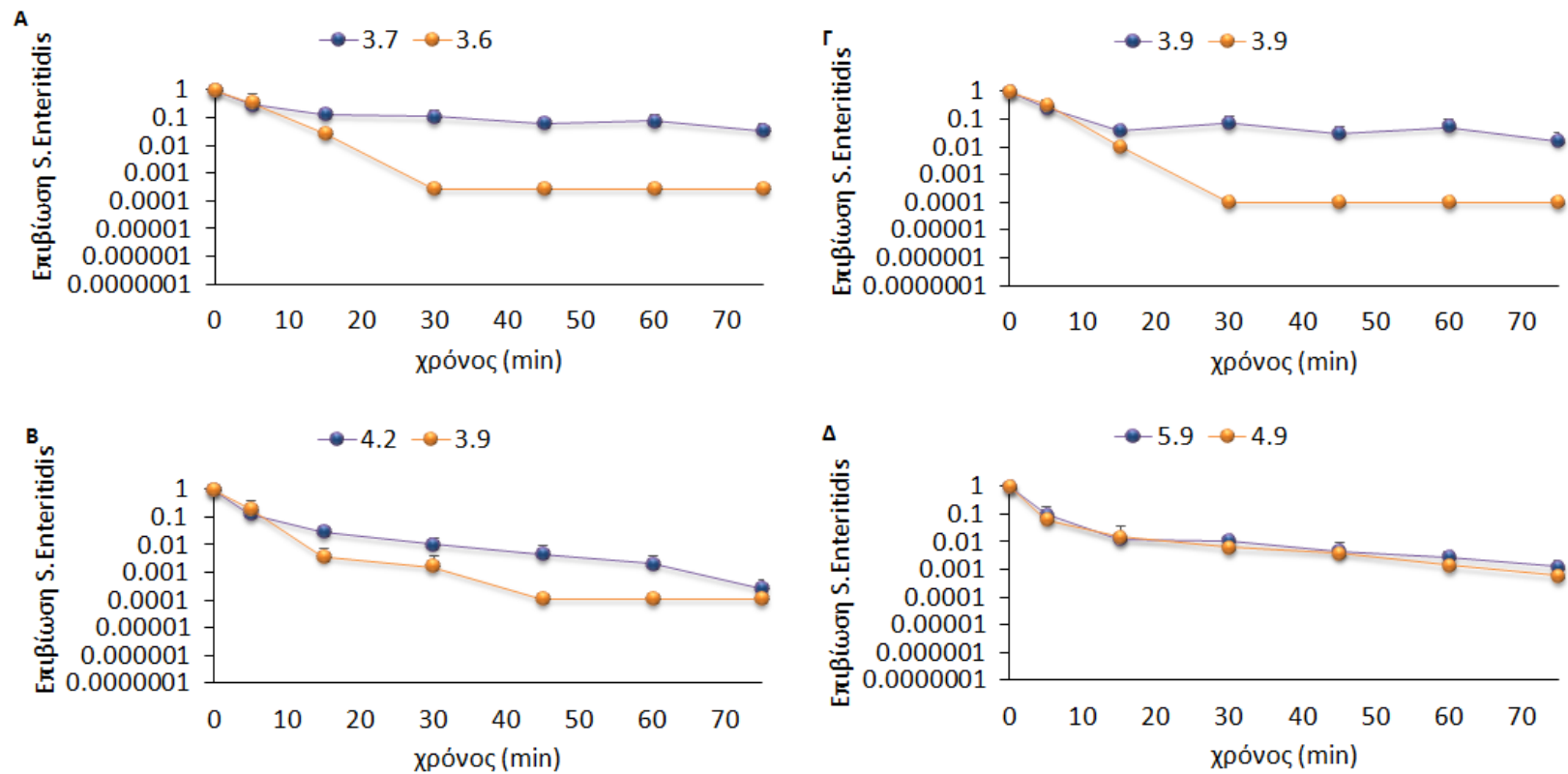


**Γράφημα 3.4** Επιβίωση των ολικών κυττάρων του *S. Enteritidis* που εποικίζουν μαρούλι (Α), σπανάκι (Β), βλίτα (Γ), ρόκα (Δ) και ιταλικά χόρτα (Ε) ως προς τον χρόνο κατά την έκθεσή του παθογόνου σε όξινη καταπόνηση (pH 2.7) μετά από συντήρηση του λαχανικού στους 5 °C για 2 h (μπλε) ή 48 h (μπλε διακεκομμένη) και στους 20 °C για 2 h (κόκκινο) ή 48 h (κόκκινη διακεκομμένη). Η επιβίωση εκφράζεται ως ο λόγος των επιβιωσάντων κυττάρων σε κάθε χρονική στιγμή ( $t_x$ ) προς τον αρχικό πληθυσμό  $t_0$ , ενώ στο επάνω μέρος κάθε γραφήματος αναφέρονται οι αρχικοί πληθυσμοί του καθενός (log CFU/g).

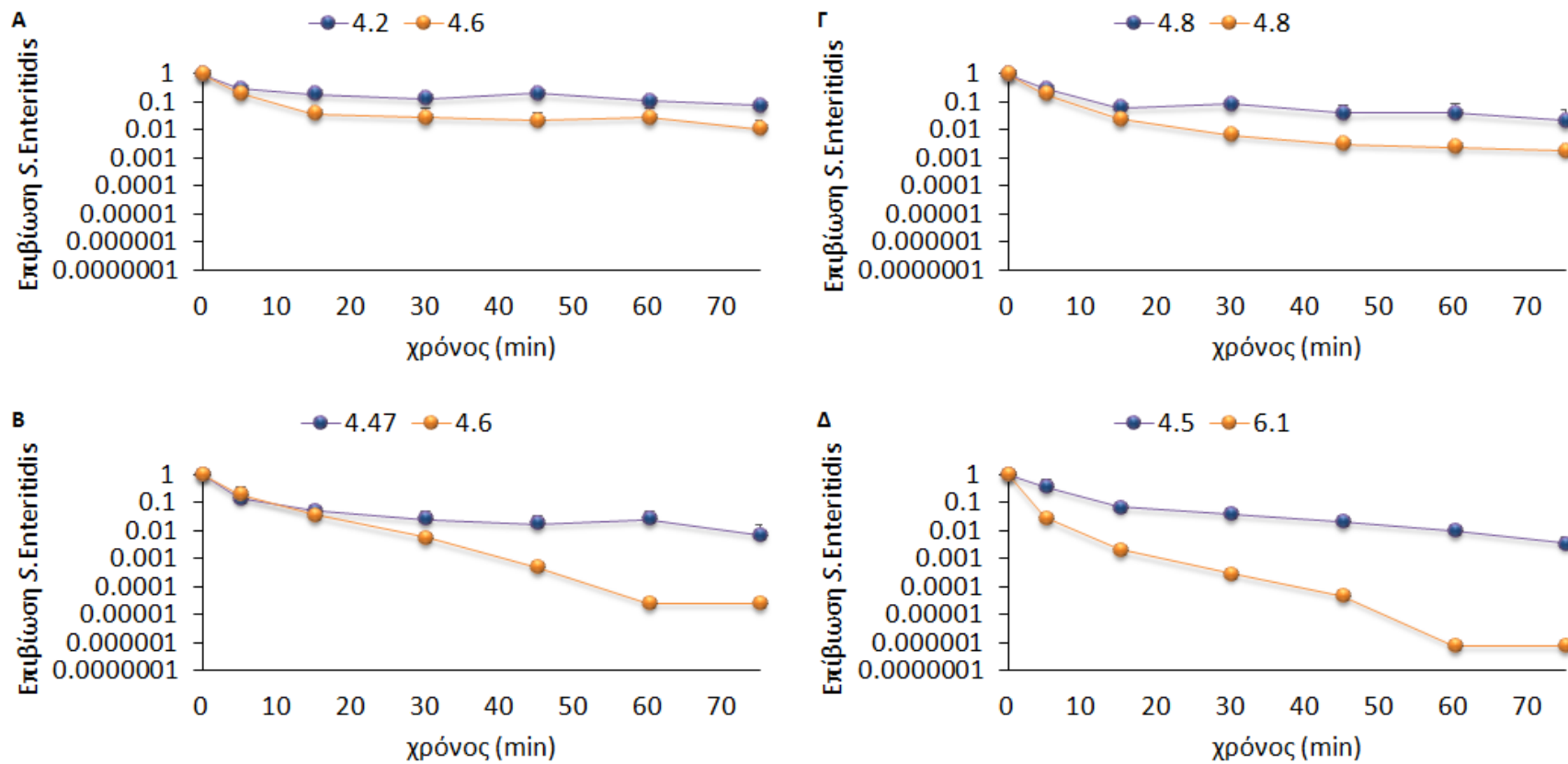


Σε ότι αφορά το μαρούλι (Γράφημα 3.5), ενώ δεν παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές στην οξεοανθεκτικότητα του ολικού πληθυσμού, παρατηρώντας τους υποπληθυσμούς των προσκολλημένων και των εσωτερικοποιημένων κυττάρων φαίνεται ότι τα προσκολλημένα κύτταρα ήταν περισσότερο οξεοανθεκτικά σε σχέση με τα εσωτερικοποιημένα στις πρώτες 2 h μετά τον εμβολιασμό καθώς ο εσωτερικοποιημένος πληθυσμός μειώθηκε κάτω του ορίου ανίχνευσης από τα πρώτα 30 min της όξινης καταπόνησης. Παρατεταμένη παραμονή (48 h) στους 5 °C είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση τόσο των προσκολλημένων, όσο και των εσωτερικοποιημένων κυττάρων του παθογόνου υπό του ορίου ανίχνευσης μετά από 75 min και 45 min έκθεσης σε χαμηλό pH αντίστοιχα. Αντίθετα, παραμονή του παθογόνου στο μαρούλι για 48 h στους 20 °C είχε ως αποτέλεσμα την εξίσωση της οξεοανθεκτικότητας σε όλους τους πληθυσμούς (εσωτερικοποιημένο, προσκολλημένο και ολικό) και καταμέτρηση ακόμα και μετά από 75 min όξινης καταπόνησης.

Σύμφωνα με τη διαγραμματική απεικόνιση της επιβίωσης του *S. Enteritidis* κατά τη διάρκεια όξινης καταπόνησης σε σπανάκι (Γράφημα 3.6), ενώ η επιβίωση των ολικών κυττάρων παρουσιάζει παρόμοια τάση με αυτή στο μαρούλι, σε ότι αφορά την επιβίωση των δύο υποπληθυσμών το φαινόμενο φαίνεται να αντιστρέφεται. Πιο συγκεκριμένα, μετά από σύντομη (2 h) παραμονή του παθογόνου σε σπανάκι, τόσο τα προσκολλημένα όσο και τα εσωτερικοποιημένα κύτταρα φαίνονται να έχουν αυξημένη οξεοανθεκτικότητα, ανεξαρτήτως θερμοκρασίας συντήρησης. Αντίθετα, παρατεταμένη παραμονή (48 h) του παθογόνου στο σπανάκι είχε ως αποτέλεσμα την ευαισθητοποίηση των εσωτερικοποιημένων κυττάρων τόσο στους 5 °C όσο και στους 20 °C έναντι ακόλουθης όξινης καταπόνησης. Επιπλέον, ο παρατεταμένος χρόνος συντήρησης (48 h), ανεξαρτήτου θερμοκρασίας, φαίνεται να ευαισθητοποιεί τα εσωτερικοποιημένα κύτταρα με αποτέλεσμα τη μείωση των πληθυσμών κάτω από το όριο ανίχνευσης σε αντίθεση με τα προσκολλημένα που φαίνονται να μην επηρεάζονται. Πιο συγκεκριμένα, συντήρηση για 48 h στους 5 °C μετά από 60 min όξινης καταπόνησης, οδήγησε σε μείωση των εσωτερικοποιημένων κυττάρων κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (1 log CFU/g). Παρομοίως, τα εσωτερικοποιημένα κύτταρα του παθογόνου έπειτα από προηγούμενη παραμονή στους 20 °C για 48 h μειώθηκαν κάτω του ορίου ανίχνευσης στα 60 min όξινης καταπόνησης.



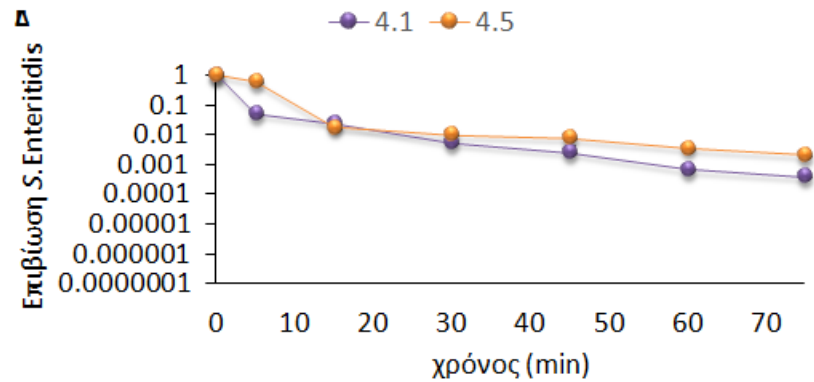
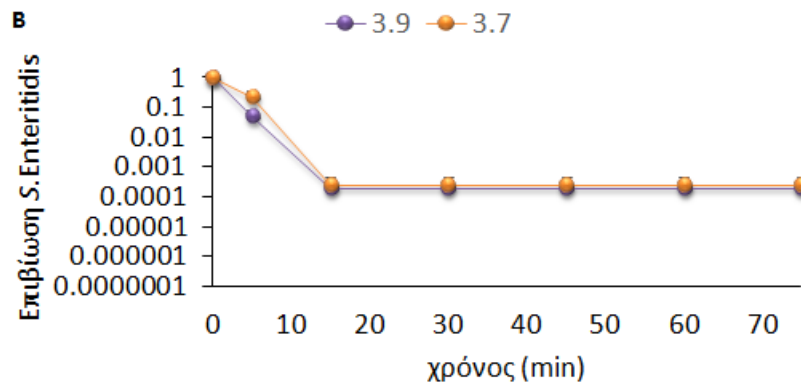
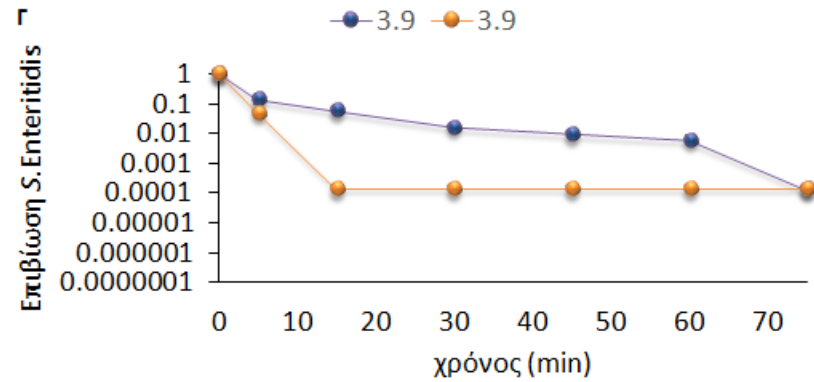
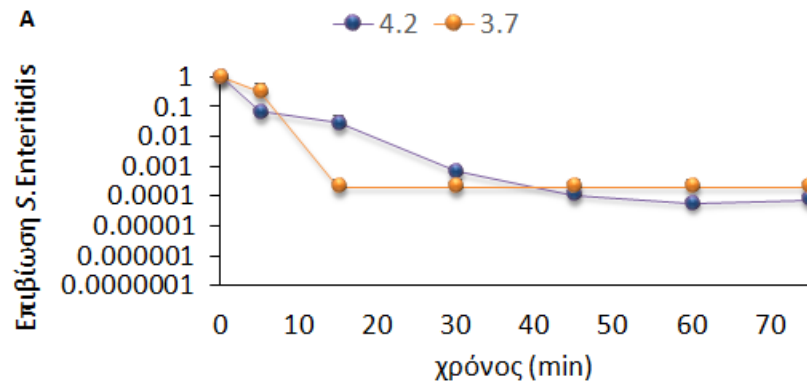
**Γράφημα 3.5** Επιβίωση του *S. Enteritidis* που εποικίζει μαρούλι, ως προς το χρόνο κατά την έκθεσή του παθογόνου σε όξινη καταπόνηση (pH 2.7) μετά από συντήρηση του λαχανικού στους 5 °C για 2 h (A) ή 48 h (B) και στους 20 °C για 2 h (Γ) ή 48 h (Δ). Η επιβίωση εκφράζεται ως ο λόγος των επιβιωσάντων κυττάρων σε κάθε χρονική στιγμή (tx) προς τον αρχικό πληθυσμό t0. Με διαφορετικό χρώμα απεικονίζονται τα προσκολλημένα (μπλε) και εσωτερικοποιημένα (κίτρινο) κύτταρα του παθογόνου, ενώ στο επάνω μέρος κάθε γραφήματος αναφέρονται οι αρχικοί πληθυσμοί του καθενός (log CFU/g).



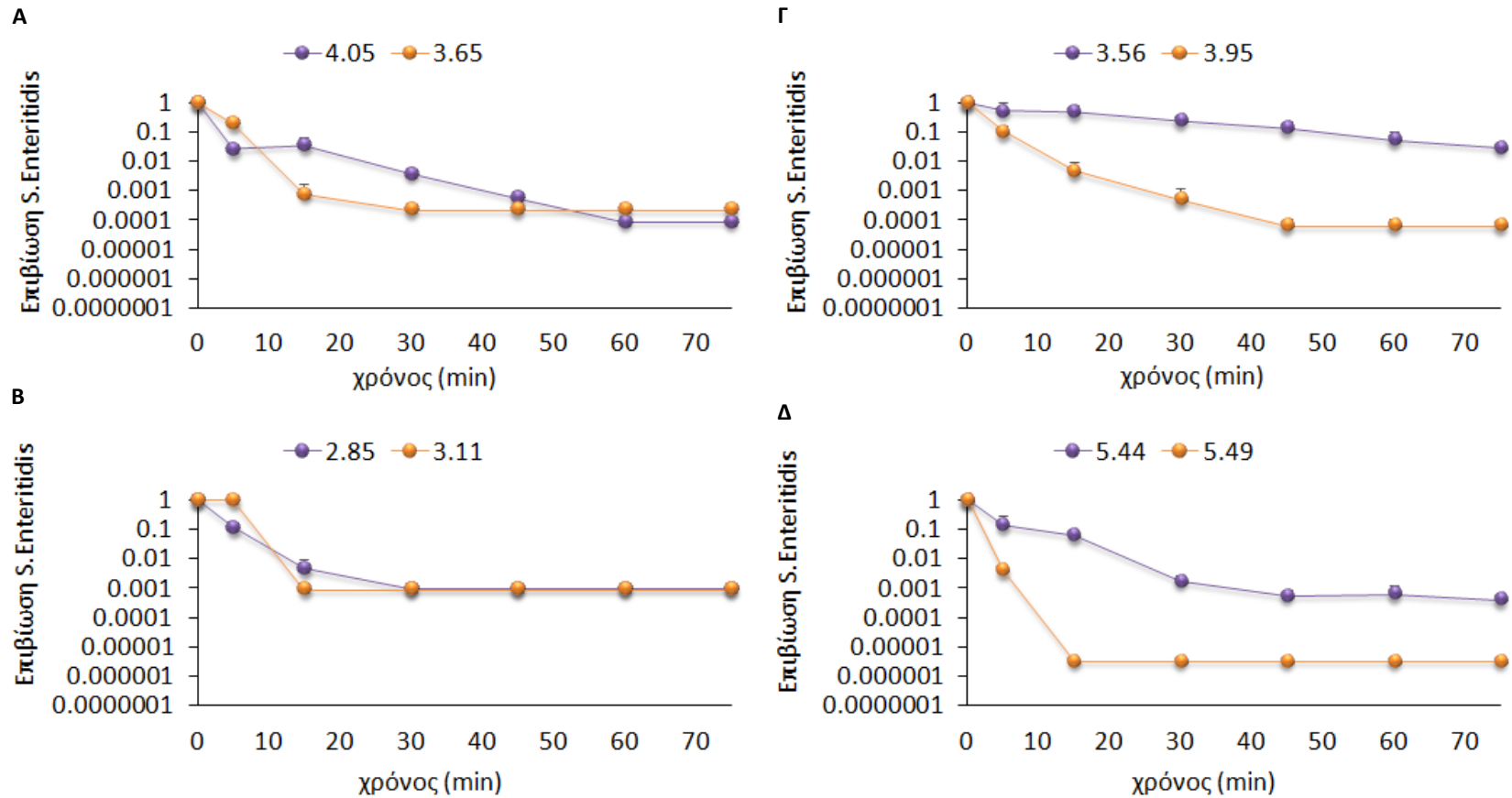
**Γράφημα 3.6** Επιβίωση του *S. Enteritidis* που εποικίζει σπανάκι, ως προς το χρόνο κατά την έκθεσή του παθογόνου σε όξινη καταπόνηση (pH 2.7) μετά από συντήρηση του λαχανικού στους 5 °C για 2 h (A) ή 48 h (B) και στους 20 °C για 2 h (Γ) ή 48 h (Δ). Η επιβίωση εκφράζεται ως ο λόγος των επιβιωσάντων κυττάρων σε κάθε χρονική στιγμή (tx) προς τον αρχικό πληθυσμό t0. Με διαφορετικό χρώμα απεικονίζονται τα προσκολλημένα (μπλε) και εσωτερικοποιημένα (κίτρινο) κύτταρα του παθογόνου, ενώ στο επάνω μέρος κάθε γραφήματος αναφέρονται οι αρχικοί πληθυσμοί του καθενός (log CFU/g).

Παραμονή του παθογόνου στην επιφάνεια ή το εσωτερικό των βλίτων (Γράφημα 3.7), 2 h μετά τον εμβολιασμό είτε στους 5 °C είτε στους 20 °C είχε ως αποτέλεσμα την ευαισθητοποίηση των εσωτερικοποιημένων κυττάρων έναντι των προσκολλημένων. Σε ότι αφορά την παραμονή του παθογόνου για 48 h στα βλίτα σε θερμοκρασία 5 °C, ο πληθυσμός των εσωτερικοποιημένων και προσκολλημένων κυττάρων μειώθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης ήδη μετά από τα πρώτα 15 min έκθεσης σε χαμηλό pH γεγονός που είναι σύμφωνο με την παρατηρούμενη μείωση του ολικού πληθυσμού του παθογόνου. Παραμονή δε, του παθογόνου σε βλίτα, σε θερμοκρασία 20 °C για 48 h είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή οξεοανθεκτικότητας των εσωτερικοποιημένων κυττάρων, τα οποία φαίνεται να έχουν καλύτερη επιβίωση έναντι των προσκολλημένων κατά την έκθεσή τους σε ακραία όξινη καταπόνηση, με τον πληθυσμό τους να μειώνεται κάτω του ορίου ανίχνευσης μετά από 75 min, φαινόμενο το οποίο παρατηρείται και κατά την παραμονή του παθογόνου σε φυτικό ιστό μαρουλιού.

Σε ότι αφορά τη ρόκα, η οξεοανθεκτικότητα του *Salmonella* φαίνεται να μειώνεται κατά τη συντήρηση στους 20 °C για 2 ημέρες. Πιο συγκεκριμένα, η συντήρηση σε χαμηλές θερμοκρασίες είχε ως αποτέλεσμα τη μη επιβίωση τόσο του ολικού πληθυσμού όσο και των προσκολλημένων και των εσωτερικοποιημένων υποπληθυσμών και μετά από 2 h και μετά από 48 h. . Συντήρηση στους 5 °C για 48 h, οδήγησε σε μείωση των προσκολλημένων και των εσωτερικοποιημένων κυττάρων κάτω από το όριο ανίχνευσης μετά από 30 min και 15 min όξινης καταπόνησης, αντίστοιχα. Αντίθετα, η συντήρηση της ρόκας για 2 h στους 20 °C, έδειξε ότι ο προσκολλημένος πληθυσμός ήταν περισσότερο οξεοανθεκτικός από ότι ο εσωτερικοποιημένος καθώς τα κύτταρα συνέχιζαν να ανακτώνται και μετά τα 70 min έκθεσης σε όξινη καταπόνηση. Παραμονή του παθογόνου στη ρόκα στους 20 °C για 2 ημέρες ευαισθητοποίησε και τους δύο υποπληθυσμούς και ιδιαίτερα τα εσωτερικοποιημένα κύτταρα, καθώς μειώθηκαν κάτω από το όριο ανίχνευσης μετά τα 15 min έκθεσης σε όξινη καταπόνηση.



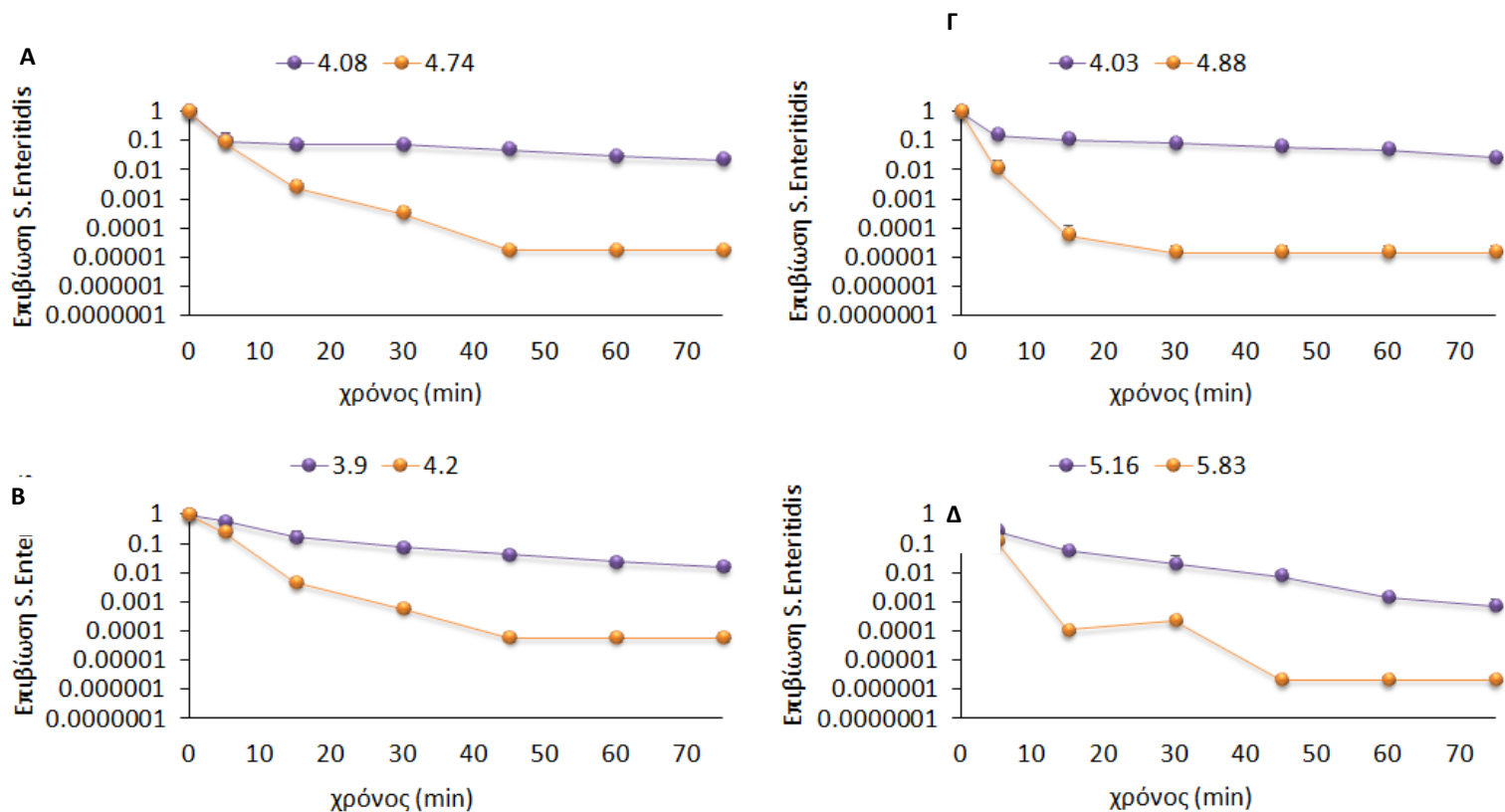
**Γράφημα 3.7** Επιβίωση του *S. Enteritidis* που εποικίζει βλίτα, ως προς το χρόνο κατά την έκθεσή του παθογόνου σε όξινη καταπόνηση (pH 2.7) μετά από συντήρηση του λαχανικού στους 5 °C για 2 h (Α) ή 48 h (Β) και στους 20 °C για 2 h (Γ) ή 48 h (Δ). Η επιβίωση εκφράζεται ως ο λόγος των επιβιωσάντων κυττάρων σε κάθε χρονική στιγμή (tx) προς τον αρχικό πληθυσμό t0. Με διαφορετικό χρώμα απεικονίζονται τα προσκολλημένα (μπλε) και εσωτερικοποιημένα (κίτρινο) κύτταρα του παθογόνου, ενώ στο επάνω μέρος κάθε γραφήματος αναφέρονται οι αρχικοί πληθυσμοί του καθενός (log CFU/g).



**Γράφημα 3.8** Επιβίωση του *S. Enteritidis* που εποικίζει ρόκα, ως προς το χρόνο κατά την έκθεσή του παθογόνου σε όξινη καταπόνηση (pH 2.7) μετά από συντήρηση του λαχανικού στους 5 °C για 2 h (A) ή 48 h (B) και στους 20 °C για 2 h (Γ) ή 48 h (Δ). Η επιβίωση εκφράζεται ως ο λόγος των επιβιωσάντων κυττάρων σε κάθε χρονική στιγμή (tx) προς τον αρχικό πληθυσμό t0. Με διαφορετικό χρώμα απεικονίζονται τα προσκολλημένα (μπλε) και εσωτερικοποιημένα (κίτρινο) κύτταρα του παθογόνου, ενώ στο επάνω μέρος κάθε γραφήματος αναφέρονται οι αρχικοί πληθυσμοί του καθενός (log CFU/g).

Σύμφωνα με το Γράφημα 3.9, η εποίκιση του παθογόνου στα ιταλικά χόρτα είχε σαν αποτέλεσμα την ευαισθητοποίηση του εσωτερικοποιημένου πληθυσμού σε όλες τις περιπτώσεις ανεξαρτήτως χρόνου και θερμοκρασίας. Συγκεκριμένα, τόσο στους 5 °C όσο και στους 20 °C, για συντήρηση 2 h και 48 h, ο υποπληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων επιβιώνει ακόμα και μετά τα 70 min όξινης καταπόνησης. Αντίθετα, ο υποπληθυσμός των εσωτερικοποιημένων κυττάρων φαίνεται να ευαισθητοποιείται σε όλες τις συνθήκες και να μειώνεται κάτω από το όριο ανίχνευσης μετά τα 45 min έκθεσης σε συνθήκες όξινης καταπόνησης. Η συμπεριφορά του παθογόνου στα ιταλικά χόρτα στους 20 °C τόσο στις 2 h όσο και στις 48 h είναι παρόμοια με εκείνη της ρόκας.

Οι έρευνες σχετικά με την επίδραση της παραμονής του παθογόνου *Salmonella* spp. σε διαφορετικές επιφάνειες λαχανικών στη μετέπειτα απόκριση του παθογόνου σε ακραίες καταπονήσεις είναι περιορισμένες. Σε έρευνα των Roimenidou *et al.*, (2012) μελετήθηκε η οξεοανθεκτικότητα κυττάρων *Salmonella* spp. τα οποία είχαν προσκολληθεί σε μαρούλι και τοματίνια. Η όξινη καταπόνηση διενεργήθηκε σε pH 1.5 και pH 3.5 (HCl). Παραμονή του παθογόνου στις επιφάνειες των λαχανικών σε χαμηλή θερμοκρασία (5 °C) είχε ως αποτέλεσμα την ακαριαία θανάτωση του παθογόνου έναντι ακόλουθης έκθεσής του σε pH 1.5, ενώ σε έκθεση του σε pH 3.5 δεν παρατηρήθηκε ευαισθητοποίηση των κυττάρων.



**Γράφημα 3.9** Επιβίωση του *S. Enteritidis* που εποικίζει ιταλικά χόρτα, ως προς το χρόνο κατά την έκθεσή του παθογόνου σε όξινη καταπόνηση (pH 2.7) μετά από συντήρηση του λαχανικού στους 5 °C για 2 h (Α) ή 48 h (Β) και στους 20 °C για 2 h (Γ) ή 48 h (Δ). Η επιβίωση εκφράζεται ως ο λόγος των επιβιωσάντων κυττάρων σε κάθε χρονική στιγμή ( $t_x$ ) προς τον αρχικό πληθυσμό  $t_0$ . Με διαφορετικό χρώμα απεικονίζονται τα προσκολλημένα (μπλε) και εσωτερικοποιημένα (κίτρινο) κύτταρα του παθογόνου, ενώ στο επάνω μέρος κάθε γραφήματος αναφέρονται οι αρχικοί πληθυσμοί του καθενός (log CFU/g).



Με δεδομένο ότι μία σύντομη πέψη διαρκεί περίπου 60 min και σε συνδυασμό με τον ανακτώμενο πληθυσμό του παθογόνου τη χρονική στιγμή  $t=60\text{min}$  της έκθεσης σε όξινη καταπόνηση είναι δυνατόν να εκτιμηθεί ο αριθμός των κυττάρων του παθογόνου που δυνητικά μπορεί να υπερβεί το «εμπόδιο» του χαμηλού pH του στομάχου. Με βάση τον πίνακα 3.4, στις περισσότερες περιπτώσεις η προσκόλληση του παθογόνου επάνω στο λαχανικό δύναται να έχει ως αποτέλεσμα την μετέπειτα επιβίωση του παθογόνου στο λαχανικό έναντι ακραίας όξινης καταπόνησης, όπως στο περιβάλλον του ανθρώπινου στομάχου.

Με βάση δεδομένα από το Γράφημα 3.6 και τον Πίνακα 3.4, στο μαρούλι, ο κίνδυνος επιβίωσης κυττάρων *S. Enteritidis* κατά την πέψη επιμολυσμένου λαχανικού έγκειται περισσότερο στην οξεοανθεκτικότητα των προσκολλημένων κυττάρων και λιγότερο των εσωτερικοποιημένων κυττάρων, τα οποία είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης. Αντίθετα, στο σπανάκι ο κίνδυνος έγκειται τόσο στα προσκολλημένα, όσο και στα εσωτερικοποιημένα κύτταρα *S. Enteritidis*, τα οποία δυνητικά επιβιώνουν μίας σύντομης πέψης παρουσιάζοντας περίπου  $2.5 \log \text{CFU/g}$  επιβίωσαντες. Σημαντικό δε, είναι το γεγονός ότι η επιβίωση αυτή προέρχεται από κύτταρα του παθογόνου που έχουν εσωτερικοποιηθεί στη φυλλική επιφάνεια του σπανακιού σε μόλις 2 h σε θερμοκρασία είτε  $5^\circ\text{C}$ , είτε  $20^\circ\text{C}$  και είναι αδύνατο να απομακρυνθούν με τις συμβατικές μεθόδους εξυγίανσης των λαχανικών σε οικιακό ή ακόμη και βιομηχανικό επίπεδο. Σε ότι αφορά τα βλίτα, φαίνεται ότι αποτελούν παρεμποδιστικό για το παθογόνο περιβάλλον όσον αφορά στην μετέπειτα απόκριση του παθογόνου σε ακραία όξινη καταπόνηση. Πιο συγκεκριμένα, παραμονή του παθογόνου σε βλίτα σε χαμηλή θερμοκρασία έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του παθογόνου σε επίπεδα κάτω του ορίου ανίχνευσης μετά από έκθεση σε χαμηλό pH για 2 h. Αντίθετα, παραμονή του λαχανικού σε θερμοκρασία  $20^\circ\text{C}$  έχει ως αποτέλεσμα την επιβίωση τόσο των προσκολλημένων όσο και των εσωτερικοποιημένων κυττάρων έναντι έκθεσης σε pH στομάχου για 2 h, πλην όμως σε χαμηλούς πληθυσμούς (περίπου  $1 \log \text{CFU/g}$ ). Στη ρόκα, καθοριστικός παράγοντας για την επιβίωση του παθογόνου είναι η θερμοκρασία καθώς στους  $5^\circ\text{C}$  τόσο στις 2 h όσο και στις 48 h ο ολικός, ο προσκολλημένος και εσωτερικοποιημένος πληθυσμός των κυττάρων βρίσκεται κάτω από το όριο ανίχνευσης.

**Πίνακας 3.3** Ανακτώμενος ολικός, προσκολλημένος και εσωτερικοποιημένος πληθυσμός *S. Enteritidis* σε μαρούλι, βλίτα, σπανάκι, ρόκα και ιταλικά χόρτα, που έχουν εκτεθεί σε συνθήκες όξινης καταπόνησης έως 75 min, στις 2 h και 48 h, στους 5 °C και στους 20 °C . ΥΟΑ: υπό του ορίου ανίχνευσης.

Λαχανικό	Μαρούλι				Βλίτα				Σπανάκι			
	5°C		20°C		5°C		20°C		5°C		20°C	
	2 h	48 h	2 h	48 h	2 h	48 h	2 h	48 h	2 h	48 h	2 h	48 h
Θερμοκρασία	5°C		20°C		5°C		20°C		5°C		20°C	
Χρόνος	2 h	48 h	2 h	48 h	2 h	48 h	2 h	48 h	2 h	48 h	2 h	48 h
Ολικός πληθυσμός (log CFU/g)	1.8±0.0	2.0±0.0	3.0±0.0	3.9±0.0	ΥΟΑ	ΥΟΑ	2.9±0.0	3.8±0.0	3.0±0.0	3.6±0.0	34.0±0.0	3.5±0.00
Προσκολ/μένος πληθυσμός(log CFU/g)	2.5±0.2	1.34±0.1	2.5±0.2	3.3±0.4	ΥΟΑ	ΥΟΑ	1.6±0.3	1.0±0.1	3.3±0.1	2.7±0.1	3.1±0.6	2.4±0.4
Εσωτερικ/μένος πληθυσμός (log CFU/g)	ΥΟΑ	ΥΟΑ	ΥΟΑ	0.9±1.3	ΥΟΑ	ΥΟΑ	ΥΟΑ	1.0±1.5	2.9±0.2	ΥΟΑ	2.2±0.1	ΥΟΑ

Λαχανικό	Ρόκα				Ιταλικά χόρτα			
	5°C		20°C		5°C		20°C	
	2 h	48 h	2 h	48 h	2 h	48 h	2 h	48 h
Θερμοκρασία	5°C		20°C		5°C		20°C	
Χρόνος	2 h	48 h	2 h	48 h	2 h	48 h	2 h	48 h
Ολικός πληθυσμός(log CFU/g)	ΥΟΑ	ΥΟΑ	3.5±0.2	2.3±0.2	4.1±0.1	3.4±0.1	4.0±0.0	2.5±0.5
Προσκολ/μένος πληθυσμός(log CFU/g)	ΥΟΑ	ΥΟΑ	2.2±0.2	2.2±0.6	2.5±0.0	2.3±0.1	2.7±0.1	2.3±0.3
Εσωτερικ/μένος πληθυσμός(log CFU/g)	ΥΟΑ	ΥΟΑ	ΥΟΑ	ΥΟΑ	ΥΟΑ	ΥΟΑ	ΥΟΑ	ΥΟΑ

Αντίθετα, στους 20 °C, ο κίνδυνος επιβίωσης κυττάρων του παθογόνου μετά την κατανάλωση επιμολυσμένου λαχανικού έγκειται στην οξεοανθεκτικότητα των προσκολλημένων κυττάρων αφού τα εσωτερικοποιημένα βρίσκονται κάτω από το όριο ανίχνευσης. Τέλος, κατά την κατανάλωση των ιταλικών χόρτων ο κίνδυνος ελλοχεύει στα προσκολλημένα κύτταρα καθώς τα εσωτερικοποιημένα κύτταρα του παθογόνου βρίσκονται κάτω από το όριο ανίχνευσης ανεξαρτήτως χρόνου και θερμοκρασίας συντήρησης.

### **3.5 Πειράματα μελέτης φυτικών εκχυλισμάτων**

#### **3.5.1 Μελέτη της μείωσης του παθογόνου *Salmonella* spp. σε εκχυλίσματα φυλλωδών λαχανικών μετά από έκθεση σε όξινη καταπόνηση**

Αφού μελετήθηκε το πως επιδρά η επιφάνεια και η δομή του εκάστοτε λαχανικού στη μετέπειτα συμπεριφορά του παθογόνου έναντι όξινης καταπόνησης, το ερώτημα που γεννήθηκε ήταν το πώς επιδρά η σύσταση και η απελευθέρωση των θρεπτικών συστατικών των λαχανικών στην επιβίωση, την ανάπτυξη ή τη μείωση του παθογόνου καθώς και τι ρόλο παίζει η απουσία ή η παρουσία της ενδογενούς μικροχλωρίδας, η οποία θα μπορούσε να δράσει ανταγωνιστικά για το παθογόνο (Brandl et al., 2008).

Σύμφωνα, με έρευνες των Vescovo *et al.*, (1995), Carlin *et al.*, (1996), Liao and Fetti, (2001), Parish *et al.*, (2003) και Wei *et al.*, (2006), η ενδογενής μικροχλωρίδα (ιδιαίτερα τα οξυγαλακτικά βακτήρια) επηρεάζει την εποίκιση και την ανάπτυξη των παθογόνων βακτηρίων στην επιφάνεια των λαχανικών, καθώς ο ανταγωνισμός για χώρο και θρεπτικά συστατικά επιδρά αρνητικά στην επιβίωση του παθογόνου. Οι Lima *et al.*, (2013) ανέφεραν ότι προσκόλληση των παθογόνων σε μαρούλι που καλλιεργήθηκε με συμβατικό τρόπο ήταν αρκετή χαμηλή λόγω του υψηλού αριθμού των γαλακτικών βακτηρίων σε συνδυασμό με τον χαμηλό βαθμό τραχύτητας και υδροφοβικότητας των φύλλων.

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που πρέπει να διερευνηθεί είναι η σύσταση του εκάστοτε λαχανικού καθώς η περιεκτικότητα σε διαφορετικά θρεπτικά συστατικά (πολυφαινόλες, φλαβονοειδή, ανθοκυανίνες κ.λ.π) επηρεάζει την επίκοιση

του παθογόνου, λόγω της αντιφλεγμονώδους και αντιμικροβιακής δράσης τους (Weng and Yen, 2012; Chen and Chen, 2013; Pepe *et al.*, 2014).

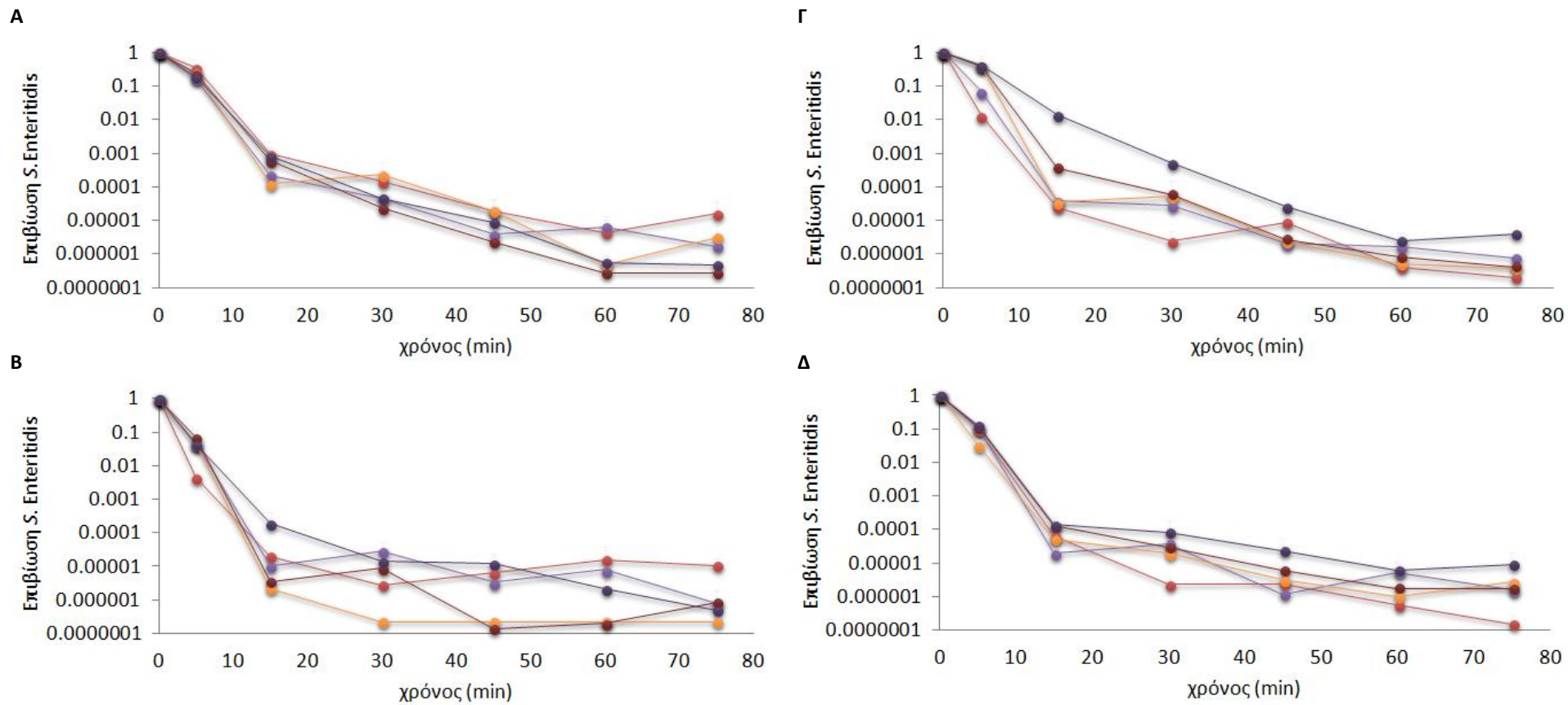
Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, προκειμένου να μελετηθεί η μείωση του παθογόνου *S. Enteritidis* σε εκχυλίσματα λαχανικών, μαρούλι, σπανάκι, βλίτα, ρόκα και ιταλικά χόρτα ομογενοποιήθηκαν με χρήση ομογενοποιητή χειρός (mixer) και εμβολιάστηκαν με το παθογόνο ( $7 \log \text{CFU/mL}$ ). Μετά από παραμονή στους  $5^\circ\text{C}$  και στους  $20^\circ\text{C}$  για 2 h και 48 h, ο μικροοργανισμός εκτέθηκε σε ακραίες συνθήκες όξινης καταπόνησης. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι σε προπειράματα που έγιναν στα λαχανικά εξετάστηκαν δύο διαφορετικοί τρόποι ομογενοποίησης του φυτικού ιστού (ομογενοποίηση με Stomacher και ομογενοποίηση με ομογενοποιητή χειρός), και τελικά επιλέχθηκε ο ομογενοποιητής χειρός καθώς ο τρόπος αυτός επέτρεπε την καλύτερη δυνατή απελευθέρωση των θρεπτικών στοιχείων του εκάστοτε λαχανικού καθώς και των εν δυνάμει παρεμποδιστικών για την ανάπτυξη του παθογόνου ουσιών, με αποτέλεσμα την καλύτερη μελέτη της φυσιολογίας του παθογόνου. Για την επιπλέον μελέτη της επίδρασης της ενδογενούς μικροχλωρίδας στην ανάπτυξη του παθογόνου, χρησιμοποιήθηκαν μη στείρα εκχυλίσματα (με παρουσία ενδογενούς μικροχλωρίδας) και στείρα εκχυλίσματα (χωρίς τη παρουσία ενδογενούς μικροχλωρίδας) (βλ.2.8.1).

Το pH των εκχυλισμάτων των λαχανικών κατά την ημέρα παραλαβής τους κυμαινόταν από 6.4 έως 6.8 ενώ μικρές μεταβολές παρατηρήθηκαν μετά από 48 h σε θερμοκρασία  $5^\circ\text{C}$  (pH 6.3 έως 6.7). Αντίθετα, συντήρηση στους  $20^\circ\text{C}$  οδήγησε σε πτώση του pH των εκχυλισμάτων (pH 4.5 έως 6.3) (Πίνακας 3.4).

**Πίνακας 3.4** pH ανεμβολίαστων και εμβολιασμένων μη στείων εκχυλισμάτων λαχανικών μετά από 2 h και μετά από 48 h συντήρησης στους 5 °C και στους 20 °C.

Μη στείρα εκχυλίσματα	2 h	48 h	
		5 °C	20 °C
<b>Σπανάκι</b>	6.8±0.0	6.7±0.0	6.3±0.1
<b>Μαρούλι</b>	6.6±0.1	6.4±0.1	4.5±0.2
<b>Βλίτα</b>	6.8±0.0	6.5±0.3	6.0±0.1
<b>Ρόκα</b>	6.4±0.2	6.3±0.2	6.0±0.1
<b>Ιταλικά χόρτα</b>	6.5±0.0	6.4±0.4	5.6±0.3

Σύμφωνα με το Γράφημα 3.11, η παραμονή του *S. Enteritidis* στα μη στείρα εκχυλίσματα είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή μιας μικρής οξεοανθεκτικότητας στους 5 °C μετά από συντήρηση 2 h. Γενικότερα, μεταξύ των διαφορετικών χρόνων και θερμοκρασιών συντήρησης δεν παρατηρήθηκαν ιδιαίτερες διαφορές στην επιβίωση του παθογόνου στα διαφορετικά φυτικά εκχυλίσματα. Οι λίγες διαφορές που παρατηρούνται σχετίζονται περισσότερο με το είδος του λαχανικού.



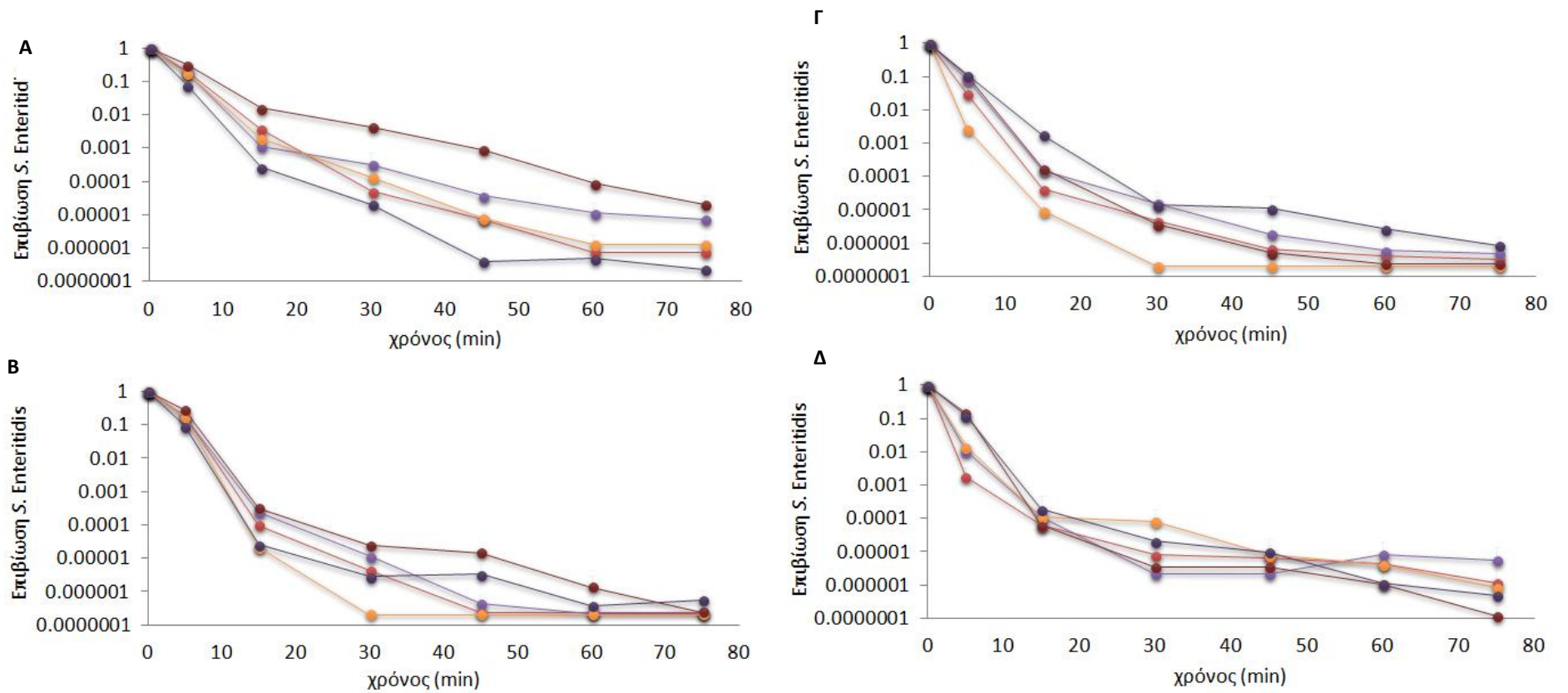
**Γράφημα 3.11** Επιβίωση του *S. Enteritidis* που εμικίζεει σπανάκι (κόκκινο), μαρούλι (μωβ), ρόκα (κίτρινο), ιταλικά χόρτα (μπορντω) και βλίτα (μπλε) ως προς το χρόνο κατά την έκθεσή του παθογόνου σε όξινη καταπόνηση (pH 2.7) μετά από συντήρηση του μη στείρου εκχυλίσματος του λαχανικού στους 5 °C για 2 h (A) ή 48 h (B) και στους 20 °C για 2 h (Γ) ή 48 h (Δ). Η επιβίωση εκφράζεται ως ο λόγος των επιβιωσάντων κυττάρων σε κάθε χρονική στιγμή (tx) προς τον αρχικό πληθυσμό t0. (n=4).

Σε ότι αφορά τα στείρα εκχυλίσματα (απουσία ενδογενούς μικροχλωρίδας), τα pH των λαχανικών κατά την ημέρα παραλαβή τους κυμαίνονταν από 5.9 έως 6.6. Μετά από παραμονή των εκχυλισμάτων για 48 h τόσο στους 5 °C όσο και στους 20 °C δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές καθώς το pH κυμαινόταν από 5.8 έως 6.6 (Πίνακας 3.6).

**Πίνακας 3.5** pH ανεμβολίαστων και εμβολιασμένων στείρων εκχυλισμάτων λαχανικών μετά από 2 h και μετά από 48 h συντήρησης στους 5 °C και στους 20 °C.

Στείρα εκχυλίσματα	2 h	48 h	
		5 °C	20 °C
<b>Σπανάκι</b>	6.6±0.0	6.6±0.1	6.6±0.1
<b>Μαρούλι</b>	6.9±0.1	5.8±0.2	5.8±0.1
<b>Βλίτα</b>	6.5±0.0	5.8±0.3	6.3±0.2
<b>Ρόκα</b>	6.2±0.0	6.1±0.2	6.1±0.1
<b>Ιταλικά χόρτα</b>	5.9±0.2	5.9±0.0	5.9±0.1

Παρατηρώντας το Γράφημα 3.12, φαίνεται ότι η απουσία της ενδογενούς μικροχλωρίδας στα εκχυλίσματα λαχανικών δεν έχει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του *S. Enteritidis* καθώς τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές με αυτά των μη στείρων εκχυλισμάτων. Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση, μια μικρή οξεοανθεκτικότητα φαίνεται να επάγεται μετά από 2 h παραμονής του παθογόνου στα εκχυλίσματα λαχανικών στους 5 °C. Μικρές διαφοροποιήσεις παρατηρούνται ανάλογα με το είδος του λαχανικού καθώς το μαρούλι και τα ιταλικά χόρτα επιτρέπουν την καλύτερη επιβίωση του παθογόνου μετά από όξινη καταπόνηση.



**Γράφημα 3.12** Επιβίωση του *S. Enteritidis* που εποικίζεει σπανάκι (κόκκινο), μαρούλι (μωβ), ρόκα (κίτρινο), ιταλικά χόρτα (μπορντώ) και βλίτα (μπλε) ως προς το χρόνο κατά την έκθεσή του παθογόνου σε όξινη καταπόνηση (pH 2.7) μετά από συντήρηση του στείρου εκχυλίσματος του λαχανικού στους 5 °C για 2 h (A) ή 48 h (B) και στους 20 °C για 2 h (Γ) ή 48 h (Δ). Η επιβίωση εκφράζεται ως ο λόγος των επιβιωσάντων κυττάρων σε κάθε χρονική στιγμή (tx) προς τον αρχικό πληθυσμό t0 (n=4).



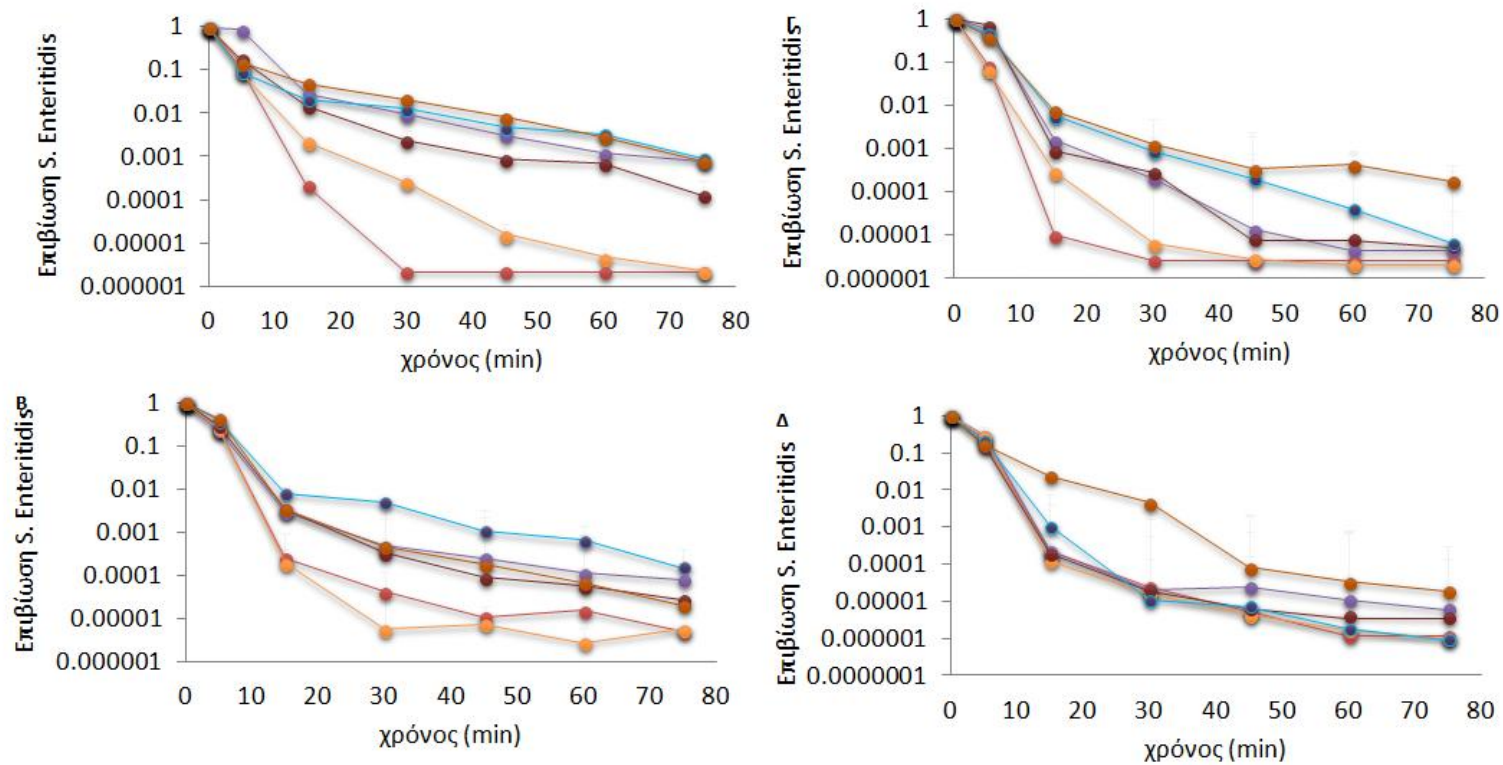
Επομένως, από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι η παρουσία της ενδογενούς χλωρίδας δε φαίνεται να επιδρά στην ανάπτυξη του παθογόνου σε φυτικά εκχυλίσματα. Άλλωστε σε αρκετές έρευνες, έχει αναφερθεί ότι η αντιμικροβιακή και η αντιφλεγμονώδης δράση των εκχυλισμάτων των λαχανικών οφείλεται κυρίως στα πολυφαινολικά τους συστατικά (Weng and Yen, 2012; Chen and Chen, 2013; Pepe *et al.*, 2014). Παρατηρώντας τα Γραφήματα, γίνεται αντιληπτό ότι στο μαρούλι και στα ιταλικά χόρτα ο *S. Enteritidis* εμφανίζει παρόμοια συμπεριφορά ως προς τη μετέπειτα οξεοανθεκτικότητα του. Τα δύο λαχανικά (μαρούλι και ιταλικά χόρτα) ανήκουν στην τάξη *Asterales* και στην οικογένεια *Asteraceae*, η οποία εκτός από τις πολυφαινολικές ενώσεις που περιέχει (υδροξυκυαναμικά οξέα, φλαβονοειδή και φαινόλες), είναι πλούσια και σε σεσκιτερπενοειδείς λακτόνες (SLs) (Ferioli *et al.*, 2015). Τα SLs είναι C-15 τερπενοειδή συστατικά χαρακτηριστικά της οικογένειας *Asteraceae* και σποραδικά συναντώμενα στις οικογένειες *Umbelliferae* και *Magnoliaceae* (Melfort, 2002), τα οποία σε συνεργισμό με τις φαινόλες ελαττώνουν το οξειδωτικό στρες (Braca *et al.*, 2011).

Κάτι άλλο το οποίο αξίζει να αναφερθεί είναι ότι σε πειράματα τα οποία έγιναν σε φυτά μαρουλιού ανάπτυξης πέντε εβδομάδων, τα οποία εκτέθηκαν σε ήπια καταπόνηση όπως θερμικό σοκ (40 °C για 10 min) και ψύξη (4 °C για 24 h), παρατηρήθηκε διπλάσια έως και τριπλάσια αύξηση του φαινολικού περιεχομένου τους καθώς και σημαντική αύξηση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας (Oh *et al.*, 2009). Σε ότι αφορά την ψύξη, όπου η θερμοκρασία προσεγγίζει αυτή της παρούσας μελέτης, είναι αξιοσημείωτο ότι το φαινολικό περιεχόμενο αυξήθηκε εντός 1 h φθάνοντας τη μεγαλύτερη συγκέντρωση του μετά την πάροδο των 3 ημερών. Αυτό ενδεχομένως να εξηγεί και τη μειωμένη ανθεκτικότητα του παθογόνου στα λαχανικά αυτά καθώς ο συνεργισμός των καταπονήσεων στα οποία υποβάλλεται (χαμηλή θερμοκρασία και χαμηλό pH) σε συνδυασμό με την παραγωγή αντιμικροβιακών στοιχείων οδηγεί στην ευαισθητοποίηση του πληθυσμού. Κάτι αντίστοιχο σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό συμβαίνει και στα υπόλοιπα λαχανικά καθώς και εκείνα χαρακτηρίζονται από αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το σπανάκι όπου η ικανότητα του να μην επιτρέπει στις περισσότερες περιπτώσεις την ανάπτυξη του παθογόνου οφείλεται ενδεχομένως στη μεγαλύτερη σε σύγκριση με τα άλλα λαχανικά περιεκτικότητα του σε φλαβονοειδή, περίπου 1000 mg/kg (Lomnitski *et al.*, 2003).

### 3.5.2 Επίδραση της παρουσίας διαφορετικών φυτικών εκχυλισμάτων κατά τη διάρκεια έκθεσης του μικροοργανισμού *Salmonella* σε συνθήκες όξινης καταπόνησης

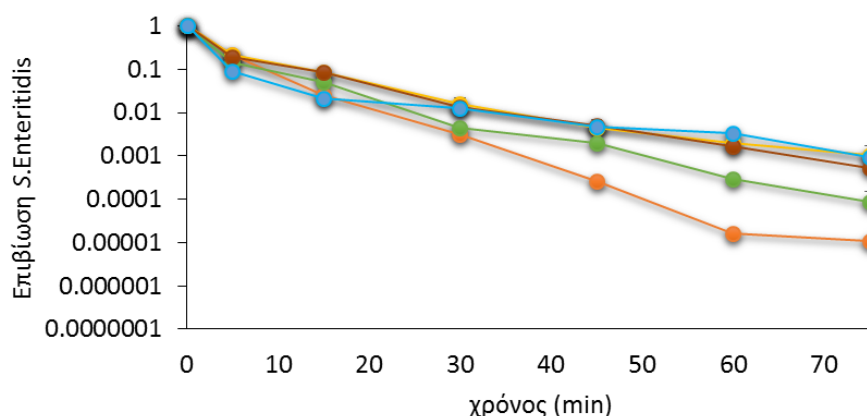
Στη συνέχεια προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της σύστασης του εκάστοτε λαχανικού στη μετέπειτα οξεοανθεκτικότητα του παθογόνου, καθώς και οι τυχόν διαφορές που υπάρχουν όταν ο εμβολιασμός του παθογόνου γίνεται απευθείας σε φυτικά εκχυλίσματα συγκριτικά με το εάν γίνει στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης του, falcon με 10 mL εργαστηριακό θρεπτικό υπόστρωμα (TSB) εμβολιάστηκαν με  $10^6$  CFU/mL *S. Enteritidis* και συντηρήθηκαν στους 5 °C και στους 20 °C για διάστημα 2 h και 48 h έως την υποβολή σε όξινη καταπόνηση (βλ. 2.8.2). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε *Salmonella* ανεπτυγμένη σε TSB, η οποία κατά την υποβολή σε όξινη καταπόνηση εκτέθηκε σε TSB με pH 2.7, χωρίς την παρουσία φυτικού ιστού.

Από το Γράφημα 3.13, φαίνεται ότι η παραμονή του *S. Enteritidis* σε θρεπτικό υπόστρωμα TSB επέτρεψε την καλύτερη επιβίωση του παθογόνου σε μετέπειτα έκθεση σε χαμηλό pH σε σχέση με την παραμονή αυτού σε φυτικά εκχυλίσματα. (στείρα και μη στείρα εκχυλίσματα). Μετά από παραμονή 2 h του παθογόνου στους 5 °C σε TSB, τα κύτταρα του παθογόνου επιβιώνουν σε όλα σχεδόν τα λαχανικά (εξαιρέση αποτελούν η ρόκα και το σπανάκι) σε αντίθεση με τη θερμοκρασία των 20 °C όπου ο πληθυσμός του μειώνεται υπό του ορίου ανίχνευσης μετά τα 45 min. Η ανθεκτικότητα του παθογόνου στους 5 °C, ενδεχομένως να οφείλεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα του παθογόνου προέρχονται από 2<sup>η</sup> ανανέωση ενώ ο μεταβολισμός τους είναι πιο αργός καθώς συντηρούνται σε χαμηλή θερμοκρασία. Σε ότι αφορά την παρατεταμένη παραμονή του παθογόνου (48 h) στις δύο θερμοκρασίες, ο πληθυσμός του μικροοργανισμού παραμένει ανθεκτικός στους 5 °C, ενώ φαίνεται να ευαισθητοποιείται στους 20 °C.



**Γράφημα 3.13** Επιβίωση του *S. Enteritidis* που επουκίζει TSB+σπανάκι (κόκκινο), TSB+μαρούλι (μωβ), TSB+ρόκα (κίτρινο), TSB+ιταλικά χόρτα (μπορντώ), TSB+βλίτα (πορτοκαλί) και TSB (μπλε) ως προς το χρόνο κατά την έκθεσή του παθογόνου σε όξινη καταπόνηση (pH 2.7) μετά από συντήρηση του εκχυλίσματος του λαχανικού στους 5 °C για 2 h (Α) ή 48 h (Β) και στους 20 °C για 2 h (Γ) ή 48 h (Δ). Η επιβίωση εκφράζεται ως ο λόγος των επιβιωσάντων κυττάρων σε κάθε χρονική στιγμή (tx) προς τον αρχικό πληθυσμό t0 (n=4).

Με σκοπό να διερευνηθεί η πιθανή επίδραση της σύστασης του λαχανικού στην απόκριση του παθογόνου έναντι όξινης καταπόνησης πραγματοποιήθηκε η έκθεση κυττάρων 2<sup>ης</sup> ανανέωσης του παθογόνου σε συνθήκες όξινης καταπόνησης.



**Γράφημα 3.14** Επιβίωση του *S. Enteritidis* που εποικίζει TSB+σπανάκι (κόκκινο), TSB+μαρούλι (μωβ), TSB+ρόκα (κίτρινο), TSB+ιταλικά χόρτα (μπορντώ), TSB+βλίτα (πορτοκαλί) και TSB (μπλε) ως προς το χρόνο κατά την έκθεσή του παθογόνου σε όξινη καταπόνηση (pH 2.7) αμέσως μετά τη 2<sup>η</sup> ανανέωση. Η επιβίωση εκφράζεται ως ο λόγος των επιβιωσάντων κυττάρων σε κάθε χρονική στιγμή ( $t_x$ ) προς τον αρχικό πληθυσμό  $t_0$ .

Σύμφωνα με το Γράφημα 3.14, γίνεται αντιληπτό ότι περισσότερο η θερμοκρασία συντήρησης παρά ο χρόνος παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού. Η έκθεση του μικροοργανισμού σε συνθήκες όξινης καταπόνησης μετά τη 2<sup>η</sup> ανανέωση (χωρίς την πάροδο των 2 h) δεν παρουσιάζει ιδιαίτερες διαφορές σε σχέση με τη σύντομη (2 h) καθώς και την παρατεταμένη (48 h) παραμονή του παθογόνου στα λαχανικά και τη μετέπειτα έκθεση στην όξινη καταπόνηση, στη θερμοκρασία των 5 °C, καθώς και στις δύο περιπτώσεις παρατηρούνται οξεοανθεκτικοί πληθυσμοί, με εξαίρεση στο σπανάκι. Αντίθετα, διαφορές εντοπίζονται στη θερμοκρασία των 20 °C όπου ο πληθυσμός του παθογόνου εμφανίζεται ευαισθητοποιημένος τόσο μετά την πάροδο των 2 h όσο και μετά από 48 h.

### 3.6 Επίδραση της εποίκισης διαφορετικών λαχανικών στη μεταβολή των επιπέδων γονιδιακής μεταγραφής του *Salmonella* Enteritidis.

Με σκοπό τη μελέτη της φυσιολογίας των προσκολλημένων και εσωτερικοποιημένων κυττάρων *S. Enteritidis* στη φυλλική επιφάνεια φυλλωδών λαχανικών εκτιμήθηκε η μεταβολή των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που είναι γνωστό ότι σχετίζονται με τη λοιμωξιολογική δράση του μικροοργανισμού (*hilA*, *invA*, *spvR*, *ssrB*, *avrA*), με μηχανισμούς προσαρμογής και αντιμετώπισης συνθηκών καταπόνησης (*cadB*, *proV*) και με την εποίκιση του μικροοργανισμού σε βιοτικές επιφάνειες (*prgH*). Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν δύο λαχανικά τα βλίτα (Χιλαΐ, 2015) και το σπανάκι (παρούσα μελέτη), με βάση τα μικροβιολογικά δεδομένα. Πιο συγκεκριμένα στο σπανάκι παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη εσωτερικοποίηση του παθογόνου σε αντίθεση με τα βλίτα, στα οποία ο παθογόνος επέδειξε μικρή ικανότητα εσωτερικοποίησης. Επιπλέον, βάσει των πειραμάτων οξεοανθεκτικότητας, παραμονή του μικροοργανισμού στο σπανάκι είχε ως αποτέλεσμα την ευαισθητοποίηση των εσωτερικοποιημένων κυττάρων σε σχέση με τα προσκολλημένα έναντι ακόλουθης όξινης καταπόνησης, ενώ ο ολικός πληθυσμός φαινόταν να παραμένει ανεπηρέαστος. Αντίθετα, παραμονή του παθογόνου στους 5°C στα βλίτα είχε ως αποτέλεσμα την καθολική ευαισθητοποίηση του παθογόνου έναντι ακόλουθης όξινης καταπόνησης, ενώ παραμονή του παθογόνου σε βλίτα στους 20°C είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή οξεοανθεκτικότητας του εσωτερικοποιημένου πληθυσμού, δεδομένης της επιβίωσης του παθογόνου μετά τα 70 min σε έκθεση σε χαμηλό pH (2.7).

Σε προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου παρατηρήθηκε ότι η εποίκιση του παθογόνου σε βλίτα είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή γονιδίων του εκκριτικού συστήματος T3SS (*invA*, *prgH*, *avrA*, *ssrB*) στα προσκολλημένα κυρίως κύτταρα, καθώς και τη μεταβολή των επιπέδων έκφρασης του *cadB*, χωρίς όμως να υπάρχει απόλυτη συσχέτιση με την απόκριση του παθογόνου στην όξινη καταπόνηση.

Για τη μελέτη της σχετικής έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων χρησιμοποιήθηκε η PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR) και η ανίχνευση των παραγόμενων προϊόντων έγινε με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green I. Ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων

χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *16SrRNA*. Η εκτίμηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης πραγματοποιήθηκε με χρήση της εξίσωσης του Pfaffl (Pfaffl, 2004). Ως κατάσταση αναφοράς τέθηκε αυτή των κυττάρων μετά από συντήρηση σε TSB στους 20 °C για 2 h. Το σύνολο των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν βρέθηκαν βιβλιογραφικά και τα χαρακτηριστικά τους αναφέρονται στον πίνακα 2.3.

Όσον αφορά στη σχετική μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης, παραμονή του παθογόνου σε φύλλα σπανακιού για 2 h στους 5 °C φάνηκε να επάγει την έκφραση γονιδίων σχετιζόμενων με τη λοιμωξιόγδο δράση του μικροοργανισμού. Μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων έκφρασης παρουσίασε το γονίδιο *avrA* στα εσωτερικοποιημένα κύτταρα (κατά περίπου 100 φορές), ενώ στα ολικά και στα προσκολλημένα κύτταρα η μεταβολή των επιπέδων έκφρασης του ήταν >10 φορές. Μεταβολή της έκφρασης των γονιδίων *hilA*, *invA* και *spvR* παρουσιάστηκε μόνο στον ολικό πληθυσμό του παθογόνου. Τα γονίδια αυτά είναι απαραίτητα για την προσβολή των επιθηλιακών κυττάρων καθώς και την επιβίωση και εξάπλωση του παθογόνου στα κύτταρα του ξενιστή καθώς σύμφωνα με τις έρευνες των Schicora *et al.*, (2011, 2012) απουσία τέτοιων γονιδίων σε μεταλλαγμένα στελέχη του *S. Typhimurium*, οδήγησε σε μειωμένο αριθμό του παθογόνου στο φυτό *Arabidopsis thaliana*. Επιπλέον, το γονίδιο *cadB* που κωδικοποιεί το διάυλο μεταφοράς του συστήματος λυσίνης /καδαβερίνης, και συνδέεται με μηχανισμούς προσαρμογής του μικροοργανισμού *S. Typhimurium* σε ακραίες όξινες συνθήκες (Park *et al.*, 1996; Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2010) παρουσίασε θετική μεταβολή της έκφρασης του (περίπου 10 φορές) και στα ολικά και στα προσκολλημένα και στα εσωτερικοποιημένα κύτταρα του παθογόνου, γεγονός που συνάδει με τα φαινοτυπικά αποτελέσματα, καθώς στους 5 °C για 2 h και οι τρεις πληθυσμοί εμφανίζονται ως οξεοανθεκτικοί. Η επαγωγή του συγκεκριμένου γονιδίου κάτω από συνθήκες όξινης καταπόνησης έχει αναφερθεί και σε ορότυπους του *S. enterica* που εκτέθηκαν σε HCl και οξικό οξύ με pH 4.5-5.5 (Joerger *et al.*, 2005). Επιπλέον, και στις τρεις κατηγορίες κυττάρων παρατηρείται θετική μεταβολή της έκφρασης του γονιδίου *prgH*, το οποίο σχετίζεται με την προσκόλληση του παθογόνου σε βιοτικές επιφάνειες. Μεγαλύτερη θετική μεταβολή της έκφρασης του γονιδίου αυτού παρατηρείται στα εσωτερικοποιημένα κύτταρα (>100 φορές).

Παρατεταμένη παραμονή (48 h) του παθογόνου στους 5 °C, είχε ως αποτέλεσμα στα εσωτερικοποιημένα κύτταρα τη μεταβολή της έκφρασης του

γονιδίου *avrA* στα ίδια επίπεδα με αυτή που παρατηρήθηκε κατά την παραμονή του παθογόνου στους 5 °C για 2 h, ενώ στον ολικό πληθυσμό παρατηρείται υποέκφραση των γονιδίων *hilA*, *invA* και *spvR*. Επιπλέον, στα προσκολλημένα κύτταρα, παρατηρείται θετική μεταβολή των γονιδίων έκφρασης *hilA* και *spvR* κατά περίπου 10 φορές. Το γονίδιο *cadB* υπερεκφράζεται πάλι και στους τρεις υποπληθυσμούς με τη μεγαλύτερη μεταβολή της έκφρασης του να παρατηρείται στα εσωτερικοποιημένα κύτταρα (περίπου 10 φορές), γεγονός το οποίο δε συνάδει απόλυτα με τα φαινοτυπικά αποτελέσματα καθώς ο πληθυσμός των εσωτερικοποιημένων κυττάρων μετά από παρατεταμένη παραμονή στους 5 °C εμφανίζεται ως ευαισθητοποιημένος.

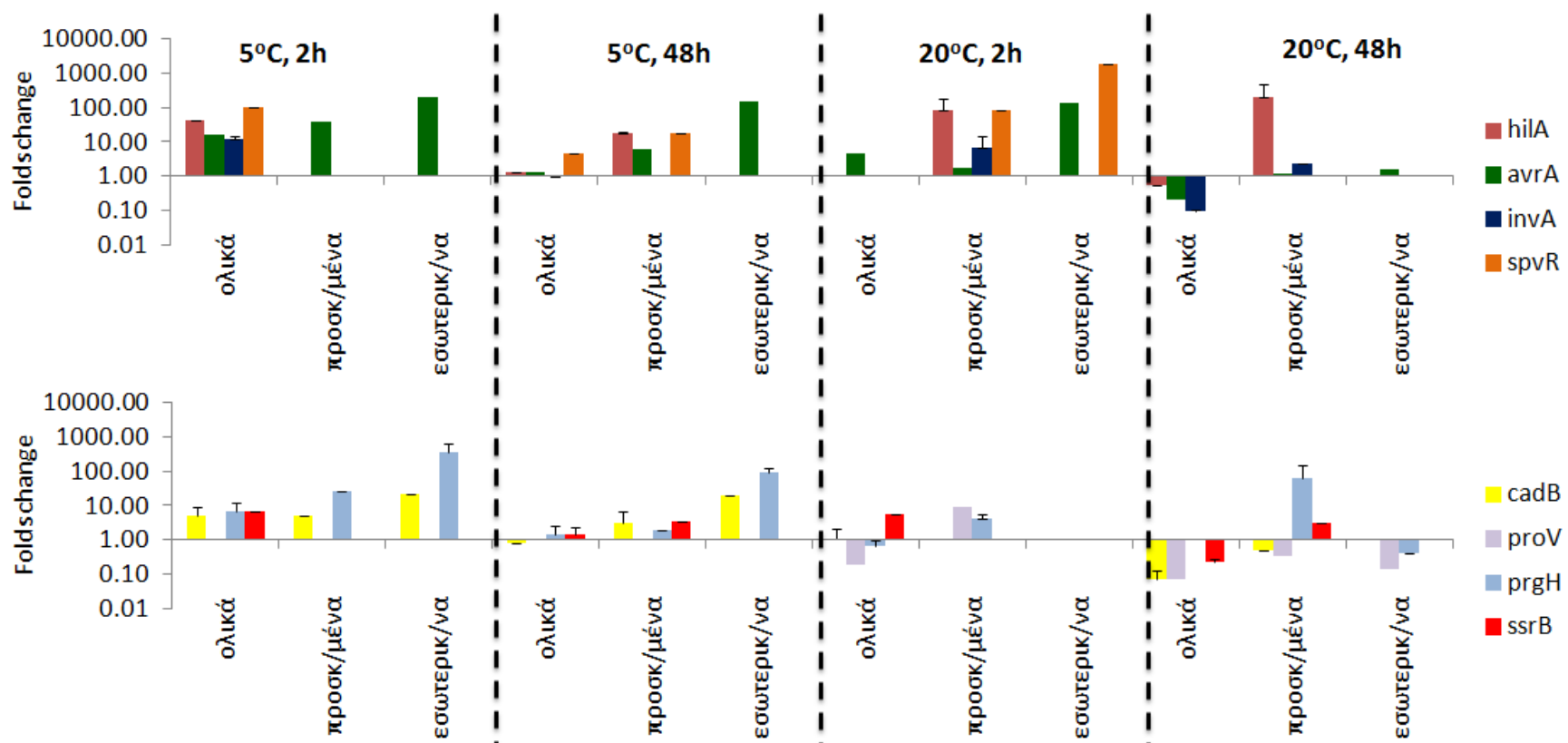
Σε ότι αφορά την παραμονή του παθογόνου για 2 h στους 20 °C, μεγαλύτερη μεταβολή της έκφρασης παρατηρείται κατά 100 φορές στο γονίδιο *spvR*, στα εσωτερικοποιημένα κύτταρα, ενώ στα προσκολλημένα κύτταρα παρατηρείται μεταβολή της έκφρασης όλων των γονιδίων σχετιζόμενων με τη λοιμωξιγόνο δράση του μικροοργανισμού αλλά σε μικρότερο βαθμό. Παρόλα αυτά, το γονίδιο *cadB*, σε ότι αφορά τον ολικό πληθυσμό δε μεταβλήθηκε σε σχέση με τη συνθήκη του μάρτυρα, ενώ σε ότι αφορά τον προσκολλημένο και τον εσωτερικοποιημένο πληθυσμό η μεταβολή του υπό μελέτη γονιδίου έκφρασης, ήταν μη ανιχνεύσιμη είτε λόγω χαμηλών επιπέδων έκφρασης είτε λόγω χαμηλού αρχικού πληθυσμού (ή χαμηλού ανακτηθέντα πληθυσμού) και επομένως δε δύναται να γίνει συσχέτιση με τα φαινοτυπικά αποτελέσματα.

Παρατεταμένη παραμονή του παθογόνου (48 h) στους 20 °C οδήγησε σε μείωση των επιπέδων σχετικής έκφρασης όλων των γονιδίων σχετιζόμενων με λοιμωξιγόνο δράση (ολικός πληθυσμός). Αντίθετα, στα προσκολλημένα κύτταρα παρατηρήθηκε θετική μεταβολή της έκφρασης του *hilA* (περίπου 100 φορές). Σε ότι αφορά το γονίδιο *cadB* στα ολικά και στα προσκολλημένα κύτταρα παρατηρήθηκε μείωση της μεταβολής της έκφρασής του κατά περίπου 10 φορές, παρ' όλο που οι πληθυσμοί αυτοί εμφανίζουν αυξημένη οξειοανθεκτικότητα.

Με βάση λοιπόν όλα τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι η έκφραση ή μη του γονιδίου *cadB* (απόκριση σε όξινη καταπόνηση) δε συνάδει απολύτως με τα αντίστοιχα φαινοτυπικά αποτελέσματα. Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκε υπερέκφραση των γονιδίων που ανήκουν στο SPI-1 (*hilA*, *prgH*, *invA*) και SPI-2 (*ssrB*, *avrA*) (Markus *et al.*, 2000, Jones *et al.*, 2005) τα οποία σχετίζονται θετικά με την αύξηση

των προσκολλημένων ή εσωτερικοποιημένων κυττάρων επάνω ή εντός του φυτικού ιστού του σπανακίου.





**Γράφημα 3.14** Σχετική μεταβολή της έκφρασης των γονιδίων *hilA* (μωροντώ), *avrA* (πράσινο), *invA* (μπλε), *spvR* (πορτοκαλί), *cadB* (κίτρινο), *proV* (μωβ), *prgH* (γαλάζιο) και *ssrB* (κόκκινο) κατά την συντήρηση σπανακίου στους 5 °C ή 20 °C για 2 h ή για 48 h. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν τη σχετική μεταβολή των επιπέδων έκφρασης κάθε γονιδίου για κάθε περίπτωση ως προς των κυττάρων *S. Enteritidis* μετά από 2 h στους 20 °C, χρησιμοποιώντας την εξίσωση του Pfaffl. Το ενδογενές γονίδιο αναφοράς *16S rRNA* χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Οι γραμμές σφάλματος απεικονίζουν την τυπική απόκλιση στα επίπεδα μεταβολής της έκφρασης των γονιδίων μεταξύ τριών βιολογικών επαναλήψεων.

#### 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώθηκε το φαινόμενο της εσωτερικοποίησης του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp στα φυλλώδη λαχανικά, γεγονός που διεγείρει την ανησυχία τόσο των παραγωγών όσο και των καταναλωτών. Το φαινόμενο της εσωτερικοποίησης καθιστά δύσκολη την απομάκρυνση του παθογόνου από τους φυτικούς ιστούς μέσω των εμπορικών απολυμαντικών ενώ χαρακτηριστικό αποτελεί ότι η ικανότητα εσωτερικοποίησης του μικροοργανισμού διαφέρει ανάλογα με το είδος του λαχανικού καθώς μεταξύ των λαχανικών που εξετάστηκαν το μεγαλύτερο βαθμό εσωτερικοποίησης παρουσίασαν το σπανάκι και τα ιταλικά χόρτα ενώ το μικρότερο βαθμό η ρόκα. Τα δεδομένα αυτά αποδεικνύουν ότι κάθε λαχανικό ενδεχομένως και να χρειάζεται διαφορετική μεταχείριση, κατά την παραγωγική διαδικασία. Συντήρηση των λαχανικών στη θερμοκρασία των 20 °C θα πρέπει να αποφεύγεται καθώς είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του εσωτερικοποιημένου πληθυσμού ή/και την αύξηση του φαινομένου της εσωτερικοποίησης.

Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τα πειράματα οξεοανθεκτικότητας αποδεικνύεται ότι ο καταναλωτής κατά την κατανάλωση επιμολυσμένων λαχανικών κινδυνεύει περισσότερο από τα προσκολλημένα κύτταρα παρά από τα εσωτερικοποιημένα τα οποία φαίνεται να ευαισθητοποιούνται έναντι όξινης καταπόνησης με αποτέλεσμα να μην επιβιώνουν στο χαμηλό pH του στομάχου.

Με βάση τα μοριακά δεδομένα, η εποίκιση του παθογόνου σε σπανάκι όμως είχε ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση γονιδίων που ανήκουν στο SPI-1 (*hilA*, *prgH*, *invA*) και SPI-2 (*ssrB*, *avrA*) και σχετίζονται με την προσκόλληση και την εσωτερικοποίηση των κυττάρων του μικροοργανισμού επάνω ή εντός του φυτικού ιστού του λαχανικού, γεγονός που γεννά διάφορα ερωτήματα. Όντως η κατανάλωση των προσκολλημένων κυττάρων είναι πιο επικίνδυνη; Εάν καταναλωθούν εσωτερικοποιημένα κύτταρα και καταφέρουν να επιζήσουν στο pH του στομάχου είναι πιο επιθετικά; Το παραπάνω ζήτημα χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω κατανόηση του φαινομένου της εσωτερικοποίησης καθώς και της επίδρασής του στη φυσιολογία του *Salmonella* spp. σε λαχανικά ευρείας κατανάλωσης δεδομένου ότι ο συγκεκριμένος παθογόνος μικροοργανισμός

καθίσταται ιδιαίτερα επικίνδυνος λόγω: α) της χαμηλής μολυσματικής δόσης του (5-10 κύτταρα), β) της αναποτελεσματικότητας των συμβατικών μέσων εξυγίανσης έναντι των εσωτερικοποιημένων κυττάρων και γ) της πιθανής μεταβολής της φυσιολογίας του μικροοργανισμού (ανθεκτικότητα/ ευαισθητοποίηση) σε σχέση με το είδος του λαχανικού. Με τον τρόπο αυτό τελικά, θα ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος ύπαρξης του παθογόνου σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης και ως εκ τούτου θα μειωθεί και ο κίνδυνος προσβολής του τελικού καταναλωτή.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona C., Viñas, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally - processed fruit and vegetables and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, **123**, 121-129.

Abu-Ashour, J and Lee, H, (2000). Transport of bacteria on sloping soil surfaces by runoff. *Environmental Toxicology*, **15**, 149-153.

Adley, C., Dillon, C., Morris, C.P., Delappe, N., Cormican, M., (2011). Prevalence of *Salmonella* in pig ear pet threats. *Food Research International*, **44**, 193-197.

Agrios, G. N., (1997). Plant pathology. Fourth edition. Academic Press. San Diego, CA.

Ailes, E.C, Leon, J.S, Jaykus, L-A, Johnston, L.M, Clayton, H.A, Blanding, S., Kleinbaum, D.G, Backer, L.C and Moe, C.L, (2008). Microbial concentrations on fresh produce are affected by postharvest processing, importation, and season. *Journal of Food Protection*, **71**, 2389-2397.

Alakomi H.L, Saarela M.H, Puhakka A, Mättö J. (2009). Effect of the fermentation pH on the storage stability of *Lactobacillus rhamnosus* preparations and suitability of in vitro analyses of cell physiological functions to predict it. *J Appl Microbiol.* **4**, 1204-12.

Allende, A., Selma, M.V, Lopez-Galvez, F., Villaescusa, R and Gil, M.I, (2008). Impact of wash water quality on sensory and microbial quality, including *Escherichia coli* cross-contamination, of fresh-cut escarole. *Journal of Food Protection*, **71**, 2514-2518.

Altier, C., (2005). Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *The Journal of Microbiology*, **43**, 85–92.

Alvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., Bernardo, A., López, M., (2010). Arginine and lysine decarboxylases and the acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium. *Int. J. Food Microbiol.* **136**, 278–82. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.024.

Andrews, J.H and Kenerley, C.M, (1978) . The effects of a pesticide program on non-target epiphytic microbial populations of apple leaves. *Canadian Journal of Microbiology*, **24**, 1058-1072.

Anonymous, (2001). Field-cored lettuce-best practices. Available online: [http://www.unitedfresh.org/assets/files/GR/Field\\_Cored\\_Lettuce\\_Best\\_Practices.pdf](http://www.unitedfresh.org/assets/files/GR/Field_Cored_Lettuce_Best_Practices.pdf), accessed April 12, 2010.

Anonymous, (2001). *Salmonella* in pork (SALINPORK). Preharvest and harvest control options based on epidemiologic, diagnostic, and economic research. Final Report. FAIR1 CT95- 0400. The Royal Veterinary and Agricultural University, Fredriksberg, Denmark, and Danish Veterinary Laboratory, Copenhagen, Denmark

Aruscavage, D., Lee, K., Miller, S., and LeJune, J. T.,(2006). Interactions affecting the proliferation and control of human pathogens on edible plants. *J. Food Sci.*, **71**, 89–99.

Arvanitoyannis, I. S., Stratakos, A., Tsarouhas, P. (2009). Irradiation applications in vegetables and fruits: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **49**, 427-462.

Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M., and Sheen, J. (2002). MAP kinase signaling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, **415**, 977-983.

Ausubel, F. M. (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunology*, **6**, 973–979.

Azeredo G.A., Montenegro Stamford T.L., Nunes P.C., Gomes Neto N.J., Gomes de Oliveira M.E., Leite de Souza E. (2011). Combined application of essential oils from

Origanum vulgare L. and Rosmarinus officinalis L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Research International*, **44**, 1541-1548.

Baertsch, C., Paez-Rubio, T., Viau, E and Peccia, J.,( 2007). Source tracking aerosols released from land-applied class B biosolids during high-wind events. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 4522-4531.

Barak, J.D., Gorski, L., Naraghi-Arani, P. and Charkowski, A.O., (2005). *Salmonella enterica* virulence genes are required for bacterial attachment to plant tissue. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 5685-5691.

Barak, J.D., Jahn, C.E., Gibson, D.L. and Charkowski, A.O, (2007). The role of cellulose and O-antigen capsule in the colonization of plants by *Salmonella enterica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **20**, 1083-1091.

Barak, J.D, Liang, A. and Narm, K.E., (2008). Differential attachment to and subsequent contamination of agricultural crops by *Salmonella enterica*. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 5568-5570.

Bartz, J. A. (1980). Causes of postharvest losses in Florida tomato shipments. *Plant Dis.*, **64**, 934–937.

Bartz, J. A., Showalter, R. K. (1981). Infiltration of tomatoes by aqueous bacterial suspensions. *Phytopathology*, **71**, 515-518.

Bearson, B. L., Wilson, L. & Foster, J. W. (1998).A low pH inducible,PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. *J. Bacteriol.* ,**180**, 2409–2417

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

Berger, C.N., Shaw, R.K., Brown, D.J., Mather, H., Clare, S., Dougan, G., Pallen, M.J. and Frankel, G., (2009). Interaction of *Salmonella enterica* with basil and other salad leaves. *ISME Journal*, **3**, 261-265.

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

Bernstein, N., Sela, S. and Neder-Lavon, S., (2007a). Effect of irrigation regimes on persistence of *Salmonella enterica* serovar Newport in small experimental pots designed for plant cultivation. *Irrigation Science*, **26**, 1-8.

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

Beuchat, L.R., (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruit and vegetables. *Microbes and Infection* ,**4**, 413–423.

Beuchat, L.R, (2006). Vectors and conditions for preharvest contamination of fruits and vegetables with pathogens capable of causing enteric diseases. *British Food Journal*, **108**, 38-53.

Beuchat, L. R., Scouten, A. J., Allen, R. I., & Hussey, R. S. (2003). Potential of a plant parasitic nematode to facilitate internal contamination of tomato plants by *Salmonella*. *Journal of Food Protection*, **66**, 1459–1461.

Bhunja, A.K (2008). Foodborne microbial pathogens: Mechanisms and Pathogenesis. United States of America: Springer Science + Business Media, LLC.

Braca, A., Dal Piaz, F., Marzocco, S., Autore, G., Vassallo, A., & De Tommasi, N. (2011). Triterpene derivatives as inhibitors of protein involved in the inflammatory process: Molecules interfering with phospholipase A(2), cyclooxygenase, and lipoxygenase. *Current Drug Targets*, **12**, 302–321.

Brandl, M. T. and Mandrell, R. E., (2002). Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the cilantro phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3614–3621.

Brandl, M.T, (2006). Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology*, **44**, 367-392.

Brandl, M.T. and Amundson, R., (2008). Leaf age as a risk factor in contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 2298-2306.

Brocklehurst, T. F., Zaman-Wong, C. M., & Lund, B. M. (1987). A note on the microbiology of retail packs of prepared salad vegetables. *Journal of Applied Bacteriology*, **63**, 409-415.

Brownson, R. C., Smith, C. A., Pratt, M., Mack, N. E., Jackson-Thompson, J., Dean, C. G., Dabney, S., Wilkerson, J. C. (1996). Preventing cardiovascular disease through community-based risk reduction: the Bootheel Heart Health Project. *American Journal of Public Health*, **86**, 206–213.

Boyen, F., Haesebrouck, F., Maes, D., Van Immerseel, F., Ducatelle, R. and Pasmans F. (2008). Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: A closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Veterinary Microbiology*, **130**(1-2): 1-19.

Buchholz, A.L, Davidson, G.R, Marks, B.P, Todd, E.C.D and Ryser, E.T, (2012). Quantitative transfer of *Escherichia coli* O157:H7 to equipment during small-scale production of fresh-cut leafy greens. *Journal of Food Protection*, **75**, 1184-1197.

Buchanan, R. L., Edelson, S. G., Miller, R. L., & Sapers, G. M. (1999). Contamination of intact apples after immersion in an aqueous environment containing *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*, **62**, 444–450.



Buck, J. W., Walcott, R. R., and Beuchat, L. R. (2003). Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. *Plant Health Progress*. Accessed online: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/2003/safety/>

Burnett, S. L., Chen, J., & Beuchat, L. R. (2000). Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to the surfaces and internal structures of apples as detected by confocal scanning laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 4679–4687.

Bustin SA, and Mueller R. (2005) Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)*, **109**, 365–79.

CAC (Codex Alimentarius Commission), 1969. General principles of food hygiene. CAC/RCP 1-1969. Adopted 1969. Revision 2003. 31 pp

CAC (Codex Alimentarius Commission), 2003. Code of hygienic practice for fresh fruits and vegetables. CAC/RCP 53-2003. Adopted 2003. Revision 2010 (new Annex III on Fresh Leafy Vegetables). 28 pp.

CAC (Codex Alimentarius Commission), (2012). Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of viruses in food. CAC/GL 79-2012. 13 pp.

Carlin, F., Nguyen-The, C., & Morris, C. E. (1996). Influence of background microflora on *Listeria monocytogenes* on minimally processed fresh broad-leaved endive (*Chichorium endiva* var. *latifolia*). *Journal of Food Protection*, **59**, 698-703.

Caponigro, V., Ventura, M., Chiancone, I., Amato, L., Parente, E., Piro, F., (2010). Variation of microbial load and visual quality of ready-to-eat salads by vegetable type, season, processor and retail. *Food Microbiology*, **27**, 1071-1077.

Casteel, M.J., Sobsey, M.D and Mueller, J.P, (2006). Fecal contamination of agricultural soils before and after hurricane-associated flooding in North Carolina.

*Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, **41**, 173-184.

Castillo, A., Mercado, I., Lucia, L.M, Martinez-Ruiz, Y., Ponce de Leon, J., Murano, E.A and Acuff, G.R, (2004). *Salmonella* contamination during production of cantaloupe: a binational study. *J Food Prot*, **67**, 713-720.

Castro-Ibañez, I., Gil, M.I and Allende, A (2013). Impact of extreme climatic events on microbial safety of leafy greens: flooding. 2013 IAFP Annual Meeting, Charlotte, North Carolina.

CDC. (2007). Multistate outbreaks of *Salmonella* infections associated with raw tomatoes eaten in restaurants-United States, 2005–2006. Morbidity and Mortality *Weekly Report*, **56**, 909–911.

Centers of Disease Control and Prevention, (2008). Investigation of outbreak of infections caused by *Salmonella* Saintpaul. Update for August 28, 2008. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, G.A.

Cevallos-Cevallos, J.M, Danyluk, M.D, Gu, G.Y, Vallad, G.E and van Bruggen, A.H.C, (2012). Dispersal of *Salmonella* Typhimurium by rain splash onto tomato plants. *Journal of Food Protection*, **75**, 472-479.

Chandler, D.S. and Craven, J.A, (1980). Relationship of soil-moisture to survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium in soils. *Australian Journal of Agricultural Research*, **31**, 547-555.

Chen, A.Y., Chen, Y.C., (2013). A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry*, **138**, 2099–2107.

Clements, M., Ericksson, S., Tezcan-Merdol, D., Hinton, J. C. D., & Rhen, M., (2001). Virulence gen regulation in *Salmonella enterica*. *Annals of Medicine*, **33**, 178–185.

Critzer, F.J and Doyle M.P., (2010). Microbial ecology of foodborne pathogens associated with produce. *Current Opinion in Biotechnology*, **21**, 125-130.

Cooley, M.B., Miller, W.G, and Mandrell, R.E., (2003). Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 4915-4926.

Cooley, M. B., Chao, D., & Mandrell, R. E. (2006). *Escherichia coli* O157:H7 survival and growth on lettuce is altered by the presence of epiphytic bacteria. *Journal of Food Protection*, **69**, 2329–2335.

Cooley, M., Carychao, D., Crawford-Miksza, L. et al. (2007). Incidence and tracking of *Escherichia coli* O157:H7 in a major produce production region in California. *PLoS One* , **2**, e1159.

Cox, J. *Salmonella*-Introduction. (2000). In: Robinson, R. K., Batt., C. A., Patel, P. D. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp.1928-1937). Academic Press, London.

Cummings, K., Barrett, E., Mohle-Boetani, J. C. et al. (2010). A multistate outbreak of *Salmonella enterica* serotype Baildon associated with domestic raw tomatoes. *CDC Emerging Infectious Diseases*. Vol. **7**: Nov–Dec 2001. [www.cdc.gov/ncidod/eid/vol7no6/cummings.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol7no6/cummings.htm)

Davies, R.H and Wray, C, (1996). Persistence of *Salmonella* Enteritidis in poultry units and poultry food. *British Poultry Science*, **37**, 589-596.

D'Aoust, J.-Y. (1998). *Salmonella* Species. In *Food Microbiology and Frontiers* (Doyle, M. P., Beuchat, L. R., and Montville, T. J., Eds.). ASM Press, Washington, DC.

D'Aoust, J. Y.( 2001). *Salmonella*. In: Labbe, R. G., García, S. (Eds.), *Guide to Foodborne Pathogens* (pp.163-191). Wiley, Hoboken, NJ.

Deering, A. J., Pruitt, R. E., Mauer, L. J., & Reuhs, B. L. (2011). Examination of the

internalization of *Salmonella* serovar Typhimurium in peanut, *Arachis hypogaea*, using immunocytochemical techniques. *Food Research International*. doi: 10.1016/j.foodres.2011.01.061.

Deering, A. J., Mauer, L. J., Prutt, R. E. (2012). Internalization of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in plants: A review. *Food Research International*, **45**, 567-575.

Dodd, C. E. R., Richards, P. J., & Aldsworth, T. G., (2007). Suicide through stress: A bacterial response to sub-lethal injury in the food environment. *International Journal of Food Microbiology*, **120**, 46–50.

Dong, Y. M., Iniguez, A. L., Ahmer, B. M. M., & Triplett, E. W. (2003). Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 1783–1790.

Donnison, A. and Ross, C, (2009). Survival and retention of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter* in contrasting soils from the Toenepi catchment. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, **52**, 133-144.

Doyle, M.P. and Erickson, M.C, (2008). Summer meeting 2007 - the problems with fresh produce: an overview. *Journal of Applied Microbiology*, **105**, 317-330.

Doyle, M.P. and Erickson, M.C, (2012). Opportunities for mitigating pathogen contamination during on farm-food production. *Int. J. Food Microbiol.*, **152**, 54-74.

Dreux, N., Albagnac, C., Carlin, F, Morris, C.E and Nguyen-The, C, (2007). Fate of *Listeria* spp. on parsley leaves grown in laboratory and field cultures. *Journal of Applied Microbiology*, **103**, 1821-1827.

Drew W., and Jones G.(1987).*Salmonella* and food handlers. *The Lancet*, **330**, 1209-1210.

Duffy, E. A., Cisneros-Zevallos, L., Castillo, A., Pillai, S. D., Ricke, S. C., & Acuff, G. R. (2005). Survival of *Salmonella* transformed to express green fluorescent protein on Italian parsley as affected by processing and storage. *Journal of Food Protection*, **68**, 687–695.

Duffy, B., Ravva, S., & Stanker, L. (2008). Cantaloupe cultivar differences as opportunistic hosts for human pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella*. *European Journal of Horticultural Science*, **73**, 73–75.

European Commission (EC), 2005, Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on Microbiological Criteria for Foodstuffs. 2005. OJ L 338, 1-26.

EC/SCF (European Commission/Health and Consumer Protection Directorate-General), (2002). Risk profile on the microbiological contamination of fruits and vegetables eaten raw. Available online: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out125\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out125_en.pdf).

Emberland, K. E., Ethelberg, S., Kuusi, M., Vold, L., Jensvoll, L., Lindstedt, B. A. et al. (2007). Outbreak of *Salmonella* Weltevreden infections in Norway, Denmark and Finland associated with alfalfa sprouts, July–October 2007. *Eurosurveill.* **12**, E071129.

Eblen, B. S., Walderhaug, M. O., Edelson-Mammel, S., Chirtel, S. J., De Jesus, A., Merker, R. I., Buchanan, R. L., Miller, A. J. (2004). Potential for internalization, growth, and survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in oranges. *Journal of Food Protection*, **67**, 1578-1584.

Ensink, J.H, Mahmood, T and Dalsgaard, A, (2007). Wastewater-irrigated vegetables: market handling versus irrigation water quality. *Tropical Medicine and International Health*, **12 Suppl 2**, 2-7.

Fan, L.M., Zhao, Z., and Assmann, S.M. (2004). Guard cells: a dynamicsignaling model. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **7**, 537–546.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations Committee on Agriculture ), (2003). Development of a framework for Good Agricultural Practices, Seventh session, COAG/2003/6, Available online: <http://www.fao.org/docrep/meeting/006/y8704e.htm>.

Farrar, J.,and Guzewich, J. (2009). Identification of the source of contamination. In: Sapers, G.M, Solomon, E.B., Matthews, K.R.,(Eds), The Produce Contamination Problem- Causes and Solutions. Elsevier Oxford, pp 48-79.

Feroli F., Manco M.A, and D'Antuono L.F (2015). Variation of sesquiterpene lactones and phenolics in chicory and endive germplasm. *Journal of Food Composition and Analysis*, **39**, 77-86.

Fierer J and Guiney D.G.(2001). Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of Salmonella infection. *J Clin Invest*,**107**, 775-80. Review.

Food and Agriculture Organization of the United Nations Committee on Agriculture/World Health Organization, (2008). Microbiological Hazards in Fresh Fruits and Vegetables. Food Quality and Standards Service, Rome.

Forshell, L.P., Ekesbo, I., (1993). Survival of *Salmonellas* in composted and not composted solid animal manures. *Journal of Veterinary Medicine*. **B 40**, 654–658.

Franz, E., Visser, A.A., Van Diepeningen, A.D., Klerks, M.M., Termorshuizen, A.J. and van Bruggen, A.H., (2007). Quantification of contamination of lettuce by GFP-expressing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Food Microbiology*, **24**, 106-112.

Franz, E. and van Bruggen, A.H.C., (2008). Ecology of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in the primary vegetable production chain. *Critical Reviews in Microbiology*, **34**, 143-161.

Franz, E., van Diepeningen, A.D., de Vos, O.J and van Bruggen, A.H.C., (2005). Effects of cattle feeding regimen and soil management type on the fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in manure, manure-amended soil, and lettuce. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 6165-6174.

Frenzen, P., Riggs, T., Buzby, T., Roberts, T., Voetsch, D., Reddy, S. (1999). *Salmonella* cost estimate update using FoodNet data. *Food Review*, **22**, 10-15.

Garrett, E. H., Gorny, J. R., Beuchat, L. R. *et al.* (2003). Microbiological safety of fresh and fresh-cut produce: Description of the situation and economic impact. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2**(Suppl), 13–19.

Ge, C., Lee, C. and Lee, J., (2012). The impact of extreme weather events on *Salmonella* internalization in lettuce and green onion. *Food Research International*, **45**, 1118-1122.

Gelting, R.J., Baloch, M.A, A. Z-BM and Selman, C., (2011). Irrigation water issues potentially related to the 2006 multistate *E. coli* O157:H7 outbreak associated with spinach. *Agricultural Water Management*, **98**, 1395- 1402.

Gerba, C. P., and Smith, J. E., (2005). Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. *Journal of Environmental Quality*, **34**, 42–48.

Gibson, D.L., White, A.P., Snyder, S.D, Martin, S., Heiss, C., Azadi, P., Surette, M. and Kay, W.W., (2006). *Salmonella* produces an O-antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. *Journal of Bacteriology*, **188**, 7722-7730.

Gil, M.I, Gómez-López, V.M, Lannoo, A-S and A. A, (2013a). Impact of extreme climatic events on microbial safety of leafy greens: flooding. 2013 IAFP Annual Meeting, Charlotte, North Carolina, USA.

Gil, M.I and Selma, M.V, (2006). Overview of hazards in fresh-cut produce production. Control and management of food safety hazards. In: Microbial Hazard Identification in Fresh Fruits and Vegetables. Ed James JA. Wiley, 155-219.

Gil, M.I, Selma, M.V, Lopez-Galvez, F. and Allende, A, (2009). Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. *International Journal of Food Microbiology*, **134**, 37-45.

Gil, M.I, Selma, M.V, Suslow, T., Jacxsens, L., Uyttendaele, M and Allende, A (2013b). Pre- and post-harvest preventive measures and intervention strategies to control microbial food safety hazards of fresh leafy vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, DOI: 10.1080/10408398.2012.657808. 1040-8398.

Girardin, H., Morris, C.E., Albagnac, C., Dreux, N., Glaux, C and Nguyen-The, C, (2005). Behaviour of the pathogen surrogates *Listeria innocua* and *Clostridium sporogenes* during production of parsley in fields fertilized with contaminated amendments. *Fems Microbiology Ecology*, **54**, 287-295.

Giusti, M., Aurigemma, C., Marinelli, L., Tufi, D., De Medici, D., Di Pasquale, S., De Vito, C., Boccia, A. (2010). The evaluation of microbial safety of fresh ready-to-eat vegetables produced by different technologies in Italy. *Journal of Applied Microbiology*, **109**, 996-1006.

Golberg, D., Kroupitski, Y., Belausov, E., Pinto, R. and Sela, S, (2011). *Salmonella* Typhimurium internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs. *International Journal of Food Microbiology*, **145**, 250-257.

Gomes, C., Silva, P da, Moreira, R., Castell-Perez, E., Ellis, A., Pedlenton, M. (2009). Understanding *E. coli* internalization in lettuce leaves for optimization of irradiation treatment. *International Journal of Food Microbiology*, **135**, 238-247.

Gomez-Lopez, V.M., Marin, A., Allende, A., Beuchat, L.R. and Gil, M.I., (2013). Postharvest handling conditions affect internalization of *Salmonella* in baby spinach during washing. *Journal of Food Protection*, **76**, 1145-1151.



Gorski, L., Parker, C.T., Liang, A., Cooley, M.B., Jay-Russell, M.T, Gordus, A.G., Atwill, E.R., Madrell, R.E., (2011). Prevalence, distribution, and diversity of *Salmonella enterica* in a major produce region of California. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**, 2734-2748.

Gray, J. T. and Fedorka-Cray, P. J (2002). *Salmonella*. In Cliver D. O. and Riemann, H. P. (Eds) Foodborne diseases, p. 55-68. San Diego: Academic Press.

Grassl GA, (2008). Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. *Curr Opin Gastroenterol.* , **24**, 22-6.

Groisman, E. A. and Ochman H.,(1997). How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol*, **5**, 343–349.

Guan, TY, Blank, G, Ismond, A and Van Acker, R. (2001). Fate of foodborne bacterial pathogens in pesticide products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**, 503-512.

Guber, A.K., Shelton, D.R., Pachepsky, Y.A., Sadeghi, A.M and Sikora ,L.J, (2006). Rainfall-induced release of fecal coliforms and other manure constituents: comparison and modeling. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 7531-7539.

Guiney, D.G (1995). The role of host cell death in *Salmonella* infections, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **289**, 131–150.

Guo, X., van Iersel, M. W., Chen, J., Brackett, R. E., & Beuchat, L. R. (2002). Evidence of association of *salmonella* with tomato plants grown hydroponically in inoculated nutrient solution. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 3639–3643.

Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, **86**, 985–990.

Han, Y., Linton, R. H., Nielsen, S. S., & Nelson, P. E. (2000). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on surface-uninjured and -injured green pepper (*Capsicum annuum* L.) by chlorine dioxide gas as demonstrated by confocal laser scanning microscopy. *Food Microbiology*, **17**, 643–655.

Hannes, D. (2003). Nontyphoid Salmonella. In Henagariu, O. Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., and Vogt, P. H. (Eds). International handbook of foodborne pathogens, p 137-149. New York: Marcel DeKker Inc.

Hanning, I.B, Nutt, J.D and Ricke, S.C, (2009). Salmonellosis outbreaks in the United States due to fresh produce: sources and potential intervention measures. *Foodborne Pathogens and Disease*, **6**, 635-648.

Harris, L.J, Farber, J.N, Beuchat, L.R, Parish, M.E, Suslow, T.V, Garret, E.H and Busta, F.F, (2003). Chapter III. Outbreaks associated with fresh produce: incidence, growth and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2**, 78-141.

Heaton, J.C., Jones, K., (2008). Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of Applied Microbiology*, **104**, 613–626.

Hengge-Aronis, R., (1996). Back to log phase:  $\sigma_s$  as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **21**, 887-893.

Herman, K., Ayer, T. L, Lynch, M. (2008). Foodborne disease outbreaks associated with leafy greens, 1973-2006. Presented at the International Conference on Emerging Infectious Diseases, Atlanta.

Hilbert, F., Smulders, F.J.M, Chopra-Dewasthaly, R and Paulsen, P, (2012). *Salmonella* in the wildlife-human interface. *Food Research International*, **45**, 603-608.

Hintz, L. D., Boyer, R. R., Ponder, M. A., Williams, R. C., & Rideout, S. L. (2010). Recovery of *Salmonella enterica* Newport introduced through irrigation water from tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit, roots, stems, and leaves. *Hortscience*, **45**(4), 675–678.

Hirneisen, K.A., Sharma, M. and Kniel, K.E., (2012). Human enteric pathogen internalization by root uptake into food crops. *Foodborne Pathogens and Disease*, **9**, 396-405.

Holley, R.A., Arrus, K.M., Ominski, K.H., Tenuta, M. and Blank, G., (2006). *Salmonella* survival in manure-treated soils during simulated seasonal temperature exposure. *Journal of Environmental Quality*, **35**, 1170-1180.

Holt J. G., (1974). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 4nd ed. Williams & Wilkins (Baltimore), 253-268 & 341-353.

Holt J. G.,( 2000). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9nd ed. Williams & Wilkins (Baltimore), 310-328 & 551-563.

Holvoet, K., Jacxsens, L., Sampers, I and Uyttendaele, M, (2012). Insight into the prevalence and distribution of microbial contamination to evaluate water management in the fresh produce processing industry. *Journal of Food Protection*, **75**, 671-681.

Holvoet, K., Sampers, I., Seynaeve, M and Uyttendaele, M, (2014b). Relationships among hygiene indicators and enteric pathogens in irrigation water, soil and lettuce and the impact of climatic conditions on contamination in the lettuce primary production. *International Journal of Food Microbiology*, **171**, 21-31.

Horby, P.W, S.J. O'Brien, G.K. Adak, C. Graham, J.I Hawker, P. Hunter, C. Lane, A.J Jawson, R.T. Mitchell, M.H Reacher, E.J. Threlfall, and L.R. Ward, (2003). A national outbreak of multi-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage (DT) associated with consumption of lettuce. *Epidemiol. Infect.* **130**, 169-178.

Howard, F.D., J.H. MacGillivray and M. Yamaguchi, (1962). Nutrient composition of fresh California-grown vegetables. Bull No 788. Calif. Agric. Exp. Sta. Univ. of California, Berkley.

Howard, M. B., & Hutcheson, S. W. (2003). Growth dynamics of *Salmonella enterica* strains on alfalfa sprouts and in waste seed irrigation water. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 548–553

Hutchison, M.L, Avery, S.M and Monaghan, J.M, (2008). The air-borne distribution of zoonotic agents from livestock waste spreading and microbiological risk to fresh produce from contaminated irrigation sources. *Journal of Applied Microbiology*, **105**, 848-857.

Ibarra-Sánchez, L. S. (2002). Microbial internalization in fruits subjected to decontamination treatments. Master's Thesis, Graduate Program in Biotechnological Processes, University of Guadalajara, Mexico.

Iniguez, A. L., Dong, Y., Carter, H. D., Ahmer, B. M., Stone, J. M., Triplett, E. W. (2005). Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, **18**, 169-178.

Islam, M., Doyle, M.P., Phatak, S.C., Millner, P. and Jiang, X., (2004a). Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Journal of Food Protection*, **67**, 1365-1370.

Islam, M., Morgan, J., Doyle, M.P., Phatak, S.C., Millner, P. and Jiang, X., (2004b). Persistence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on lettuce and parsley and in soils on which they were grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Foodborne Pathogens and Disease*, **1**, 27-35.

Islam, M., Morgan, J., Doyle, M.P, Phatak, S.C., Millner, P. and Jiang, X.P, (2004c). Fate of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in

fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 2497-2502.

Izumi, H., Poubol, J., Hisa, K. and Sera. K. (2008). Potential sources of microbial contamination of satsuma mandarin fruit in Japan, from production through packing shed. *Journal of Food Protection*, **71**, 530-538.

Itoh, Y., Sugita-Konishi, Y., Kasuga, F., Iwaki, M., Hara-Kudo, Y., Saito, N., et al. (1998). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 present in radish sprouts. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 1532–1535.

Jablasone, J., Warriner, K., & Griffiths, M. (2005). Interactions of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* plants cultivated in a gnotobiotic system. *International Journal of Food Microbiology*, **99**, 7–18.

Jahn, E.C, Charkowski O.A and Willis K.D (2008). Evaluation of isolation methods and RNA integrity for bacterial RNA quantitation. *Journal of Microbiological Methods*, **75**, 318-324.

James J, (2006). Chapter 1. Overview of microbial hazards in fresh fruit and vegetables operations. In: *Microbial Hazards Identification in Fresh Fruit and Vegetables*. Ed James J. Wiley and Sons, 1-36 pp.

Jay, M.T, Cooley, M., Carychao, D., Wiscomb, G.W., Sweitzer, R.A., Crawford-Miksza, L., Farrar, J.A., Lau, D.K., O'Connell, J., Millington, A., Asmundson, R.V., Atwill, E.R and Mandrell, R.E, (2007). *Escherichia coli* O157:H7 in feral swine near spinach fields and cattle, central California coast. *Emerging Infectious Diseases*, **13**, 1908-1911.

Joerger R.D, Sartori C, Frye J.G, Turpin J.B, Schmidt C, McClelland M, Porwollik S. (2012). Gene expression analysis of *Salmonella enterica* Enteritidis Nal(R) and *Salmonella enterica* Kentucky 3795 exposed to HCl and acetic acid in rich medium. *Foodborne Pathog Dis.*, **4**, 331-7. doi: 10.1089/fpd.2011.0984.

Johnston, L.M, Jaykus, L-A, Moll, D., Anciso, J., Mora, B and Moe, C.L, (2006). A field study of the microbiological quality of fresh produce of domestic and Mexican origin. *International Journal of Food Microbiology*, **112**, 83-95.

Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*, **444**, 323–329. doi:10.1038/nature05286.

Kang, D.H., Fung, D.Y.C., (1999). The agar overlay method for recovery of sublethally-injured microorganisms. United States Patent (pending).

Kang D.H and Fung D. Y.C (2000). Application of thin agar layer method for recovery of injured *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*, **54**, 127–132.

Kang, Y., W. H. Outlaw, Jr., P. C. Andersen, and G. B. Fiore. (2007). Guard cell apoplastic sucrose concentration—a link between leaf photosynthesis and stomatal aperture size in the apoplastic phloem loader *Vicia faba* L. *Plant Cell Environ.*, **30**, 551–558.

Kaufmann, A. F., (1966). Pets and *Salmonella* infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **149**, 1655–1661.

Kenney, S.J, Anderson, G.L, Williams, P.L, Millner, P,D and Beuchat, L.R, (2005). Persistence of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Newport, and *Salmonella* Poona in the gut of a free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*, and transmission to progeny and uninfected nematodes. *International Journal of Food Microbiology*, **101**, 227-236.

Kirkpatrick B.D, McKenzie R, O'Neill J.P, Larsson C.J, Bourgeois A.L, Shimko J, Bentley M, Makin J, Chatfield S, Hindle Z, Fidler C, Robinson B.E, Ventrone C.H, Bansal N, Carpenter C.M, Kutzko D, Hamlet S, LaPointe C, Taylor D.N.(2006). Evaluation of *Salmonella enterica* serovar Typhi (Ty2 aroC-ssaV-) M01ZH09, with a defined mutation in the *Salmonella* pathogenicity island 2, as a live, oral typhoid vaccine in human volunteers. *Vaccine*. **24**, 116-23.

Kitinoja, L. and Kader, A.A. (2002). Small-scale postharvest handling practices - A manual for horticultural crops - 4rd edition. University of California, Davis, Postharvest Horticulture Series 8E. Available online: <http://ucce.ucdavis.edu/files/datastore/234-1450.pdf>.

Klerks, M.M., Franz, E., van Gent-Pelzer, M., Zijlstra, C. and van Bruggen, A.H., (2007). Differential interaction of *Salmonella enterica* serovars with lettuce cultivars and plant-microbe factors influencing the colonization efficiency. *ISME Journal*, **1**, 620-631.

Koopmans, M., Duizer, E. 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology*, **90**, 23-41.

Kroupitski, Y., Golberg, D., Belausov, E., Pinto, R., Swartzberg, D., Granot, D. and Sela, S., (2009). Internalization of *Salmonella enterica* in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 6076-6086.

Kroupitski, Y., Pinto, R., Brandl, M. T., Belausov, E., Sela, S. (2009b). Interactions of *Salmonella enterica* with lettuce leaves. *Journal of Applied Microbiology*, **106**, 1876-1885.

Kroupitski, Y., Pinto, R., Belausov, E., Sela, S. (2011). Distribution of *Salmonella* Typhimurium in romaine lettuce leaves. *Food Microbiology*, **28**, 990-997.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al.(2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, **27**,95–125.

Kutter, S., Hartmann, A., & Schmid, M. (2006). Colonization of barley (*Hordeum vulgare*) with *Salmonella enterica* and *Listeria* spp. *FEMS Microbiology Ecology*, **56**, 262–271.

Lang M.M, Harris L.J andBeuchat L.R.(2004). Survival and recovery of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* on lettuce and parsley as

affected by method of inoculation, time between inoculation and analysis, and treatment with chlorinated water. *J Food Prot*, **67**, 1092-103.

Lapidot, A. and Yaron, S., (2009). Transfer of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from contaminated irrigation water to parsley is dependent on curli and cellulose, the biofilm matrix components. *Journal of Food Protection*, **72**, 618-623.

Lee, S., Choi, H., Suh, S., Doo, I.-S., Oh, K.-Y., Choi, E.J., Taylor, A.T.S., Low, P.S., and Lee, Y. (1999). Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiol.* **121**, 147–152.

Lehto, M., Kuisma, R., Maatta, J., Kymalainen, H-R and Maki, M, (2011). Hygienic level and surface contamination in fresh-cut vegetable production plants. *Food Control*, **22**, 469-475.

Lemoine, R. (2000). Sucrose transporters in plants: update on function and structure: a review. *Biochim. Biophys. Acta* ,**1465**, 246–262.

Leveau, J.H.J.,(2009). Microbiology: life on leaves. *Nature*, **461**, 741.

Li, H., M. B. Tajkarimi, and I. Osburn. (2008). Impact of vacuum cooling on *Escherichia coli* O157:H7 infiltration into lettuce tissue. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 3138–3142.

Lianou A. and Koutsoumanis K.P. (2011). Effect of the growth environment on the strain variability of *Salmonella enterica* kinetic behavior. *Food Microbiology*, **28**, 828-837.

Liao, C., & Fetti, W. F. (2001). Analysis of native microflora and selection of strains antagonistic to human pathogens on fresh produce. *Journal of Food Protection*, **64**, 1110-1115.



Lienemann T, Niskanen T, Guedes S, Siitonen A, Kuusi M, and Rimhanen-Finne R.(2011). Iceberg lettuce as suggested source of a nationwide outbreak caused by two *Salmonella* serotypes, Newport and Reading, in Finland in 2008. *J Food Prot.*, **74**:1035-40.

Lima, P. M., Sao Jose, J. F.B, Andrade, N. J., Pires A. S., and Ferreira S. O. (2013). Interaction between natural microbiota and physicochemical characteristics of lettuce surfaces can influence the attachment of *Salmonella* Enteritidis. *Food Control*, **30**, 157-161.

Lindow, S.E and Brandl M.T, (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Appl.Environ.microbiol.*, **69**, 1875-1883.

Liu, C., Hofstra, N. and Franz, E., (2013). Impacts of climate change on the microbial safety of pre-harvest leafy green vegetables as indicated by *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* spp. *International Journal of Food Microbiology*, **163**, 119-128.

Lomnitski L., Bergman M., Nyska A., Ben-Shaul V., and Shlomo Grossman (2003). Composition, Efficacy, and Safety of Spinach Extracts. *Nutrition and Cancer*, **46**, 222-231.

Lowell, K., Langholz, J. and Stuart, D, (2010). Safe and Sustainable: Co-Managing for Food Safety and Ecological Health in California's Central Coast Region. San Francisco, CA and Washington, D.C: Georgetown University Produce Safety Project. Available online: <http://www.producesafetyproject.org/admin/assets/files/wildlife.pdf>.

Loewen, P. C., Hu, B., Strutinsky, J. & Sparling, R. (1998) Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.*, **44**, 707–717.

Lung AJ, Lin CM, Kim JM, Marshall MR, Nordstedt R, Thompson NP and Wei CI, (2001). Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Enteritidis in cow manure composting. *Journal of Food Protection*, **64**, 1309-1314.

Luo, Y., Nou, X., Yang, Y., Alegre, I., Turner, E, Feng, H, Abadias, M and Conway, W, (2011). Determination of free chlorine concentrations needed to prevent *Escherichia coli* O157:H7 cross-contamination during fresh-cut produce wash. *Journal of Food Protection*, **74**, 352-358.

Mahapatra, A., Muthukumarappan, K., Julson, J. (2005). Applications of Ozone, Bacteriocins and Irradiation in Food Processing: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **45**, 447-461.

Manios, S. G., Konstantinidis N., Gounadaki A. S., Skandamis P. N. (2012). 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**, 318-327.

Marcus, S. L., Brumell, J.H., Pfeifer, C.G., Finlay, B.B., (2000). *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect.* **2**, 145–56.

Matthews, K.R. (2009). Leafy Vegetables. In: Sapers, G.M, Solomon, E.B., Matthews, K.R.,(Eds), *The Produce Contamination Problem- Causes and Solutions*. Elsevier Oxford, pp165-188.

McMahon, M. A. S., Xu, J., Moore, J. E., Blair, I. S., & McDowell, D. A.,(2007). Environmental stress and antibiotic resistance in food-related pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 211–217.

Mead P.S, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee J.S, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV.(1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*,**5**, 607-25. Review.

Merfort, I., (2002). Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. *Journal of Chromatography*, **967**, 115–130.

Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S. Y. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, **126**, 969–980. doi:10.1016/j.cell.2006.06.054.

Melotto, M., and Kunkel, B. N. (2013). "Virulence strategies of plant pathogenic bacteria," in *The Prokaryotes—Prokaryotic Physiology and Biochemistry, 4th Edn.*, eds E. Rosenberg, E. Stackebrand, E. F. DeLong, F. Thompson, and S. Lory (Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag), 61–82.

Mercier, J. and Lindow, S. E., (2000). Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 369–374.

Mikkelsen L.L, Naughton P.J, Hedemann M.S, Jensen B.B.(2004). Effects of physical properties of feed on microbial ecology and survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the pig gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol.*, **6**, 3485-92.

Minor Le, L., and D.A. Smith Grimond, (1989). Origine et répartition of sérovars de souches de *Salmonella* isolées en France au cours de années 1984 e 1987. *Med. Maladies Infect.*, **19**, 12-17.

Mitra, R., Cuesta-Alonso, E., Wayadande, A., Talley, J., Gilliland, S. and Fletcher, J. (2009). Effect of route of introduction and host cultivar on the colonization, internalization, and movement of the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7 in spinach. *Journal of Food Protection*, **72**, 1521-1530.

Monack D.M, Mueller A. and Falkow S. (2004). Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system, *Nature Reviews Microbiology*. **2**, 747-765.

Monge, R., Chinchilla, M. (1996). Presence of *Cryptosporidium* oocysts in fresh vegetables. *Journal of Food Protection*, **59**, 202–203.

Monteville T.J., Mathews K.R. (2005). Μικροβιολογία Τροφίμων. Εκδόσεις Ι, σελ:103-119.

Montville, T.J., and Matthews, K. R. (2008). Food Microbiology: An Introduction 2<sup>nd</sup> ed. A.S.M press, Washington, DC.

Mootian, G., Wu, W. H., & Matthews, K. R. (2009). Transfer of *Escherichia coli* O157:H7 from soil, water, and manure contaminated with low numbers of the pathogen to lettuce plants. *Journal of Food Protection*, **72**, 2308–2312.

Morse, J.L., (1899). Typhoid fever at a mass asylum. *Rep. Dept. Health Mass.*, p. 761.

Natvig, E.E., Ingham, S.C., Ingham, B.H, Cooperband, L.R, and Roper, T.R., (2002). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 2737-2744.

Ng, P.J, Fleet, G.H and Heard, G.M (2005). Pesticides as a source of microbial contamination of salad vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, **101**, 237-250.

Nguyen, C., & Carlin, F. (1994). The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **34**, 371-401.

Nguyen-the, C., Carlin, F. (2000). Fresh and Processed Vegetables. In: Lund, B. M., Baird-Parker, A. C., Gould G. W. (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food*, Vol. I (pp. 620-984). Aspen Publishers, Gaithersburg, MD.

Nygaard, K., Lassen, J., Vold, L., Andersson, Y., Fisher, I., Lofdahl, S., Threlfall, J., Luzzi, I., Peters, T., Hampton, M., Torpdahl, M., Kapperud, G., Aavitsland, P., 2008. Outbreak of *Salmonella* Thompson infections linked to imported rucola lettuce. *Foodborne Pathogens and Disease*, **5**, 165–173.

- Nurnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., & Piater, L. (2004). Innate immunity in plants and animals: Striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews*, **198**, 249–266.
- Ochman, H., Soncini, F. C., Solomon, F., Groisman, E. A., (1996). Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 7800–7804.
- Oh, M., Carey E.E, Rajashekar C.B (2009). Environmental stresses induce health-promoting phytochemicals in lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry*, **47**, 578-583.
- Okafo, C.N, Umoh, V.J and Galadima, M, (2003). Occurrence of pathogens on vegetables harvested from soils irrigated with contaminated streams. *The Science of The Total Environment*, **311**, 49-56.
- Olaimat, A.N. and Holley, R.A, (2012). Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. *Food Microbiology*, **32**, 1-19.
- Oliveira M., Usall J., Solsona C., Alegre I., Viñas I., Abadias M. (2010). Effects of packaging type and storage temperature on the growth of foodborne pathogens on shredded ‘Romaine’ lettuce. *Food Microbiology*, **27**, 375-380.
- Olson, M.E., (2000). Human and Animal Pathogens in Manure. <http://www.gov.mb.ca/agriculture/livestock/livestockopt/papers/olson.pdf> (Accessed November 17, 2005).
- Ongeng, D., Vasquez, G.A, Muyanja, C., Ryckeboer, J., Geeraerd, A.H. and Springael, D., (2011). Transfer and internalisation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in cabbage cultivated on contaminated manure-amended soil under tropical field conditions in Sub-Saharan Africa. *International Journal of Food Microbiology*, **145**, 301-310.
- Orozco, R.L, Iturriaga, M.H, Tamplin, M.L, Fratamico, P.M, Call, J.E, Luchansky, J.B and Escartin, E.F, (2008). Animal and environmental impact on the presence and

distribution of *Salmonella* and *Escherichia coli* in hydroponic tomato greenhouses. *Journal of Food Protection*, **71**, 676-683.

Pachepsky, Y., Shelton, D.R., McLain, J.E.T., Patel, J. and R.E. M, (2011). Irrigation waters as a source of pathogenic microorganisms in produce: a review. *Advances in Agronomy*, **113**, 73-138.

Pakalniskiene, J., Falkenhorst, G., Lisby, M., Madsen, S.B., Olsen, K.E., Nielsen, E.M., Mygh, A., Boel, J., Molbak, K., (2009). A foodborne outbreak of enterotoxigenic *E. coli* and *Salmonella* Anatum infection after a high-school dinner in Denmark, November 2006. *Epidemiology and Infection*, **137**, 396–401.

Parish, M. E., Beuchat, L. R., Suslow, T. V., Harris, L. J., Garrett, E. H., Farber, J. N., et al.(2003). Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2**, 161-173.

Park, Yong-K., Bearson, B., Bang, S.H., Bang, I.S. and Foster, J.W., (1996). Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.*, **20**, 605-611.

Park, S., Navratil, S., Gregory, A., Bauer, A., Srinath, I., Jun, M., Szonyi, B., Nightingale, K., Anciso, J. and Ivanek, R. (2013). Generic *Escherichia coli* contamination of spinach at the preharvest stage: effects of farm management and environmental factors. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**, 4347-4358.

Park, S., Szonyi, B., Gautam, R., Nightingale, K., Anciso, J. and Ivanek, R. (2012). Risk factors for microbial contamination in fruits and vegetables at the preharvest level: a systematic review. *Journal of Food Protection*, **75**, 2055-2081.

Parker, J.K, McIntyre, D. and Noble, R.T, (2010). Characterizing fecal contamination in stormwater runoff in coastal North Carolina, USA. *Water Research*, **44**, 4186-4194.

Prazak, A.M, Murano, E.A, Mercado, I. and Acuff, G.R, (2002). Prevalence of *Listeria monocytogenes* during production and postharvest processing of cabbage. *Journal of Food Protection*, **65**, 1728-1734.

Penteado, A. L., Eblen, B. S., & Miller, A. J. (2004). Evidence of *Salmonella* internalization into fresh mangos during simulated postharvest insect disinfestation procedures. *Journal of Food Protection*, **67**, 181–184.

Pepe G., Sommella E., Manfra M., De Nisco M., Tenore G.C, Scopa A., et al. (2015). Evaluation of anti-inflammatory activity and fast UHPLC–DAD–IT-TOF profiling of polyphenolic compounds extracted from green lettuce (*Lactuca sativa* L.; var. Maravilla de Verano). *Food Chemistry*, **167**, 153-161.

Rahme, L. G., Stevens, E. J., Wolfort, S. F., Shao, J., Tompkins, R. G., and Ausubel, F. M. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*, **268**, 1899–1902.

Ray, B., and Adams, D.M., (1984). Repair and detection of injured microorganisms. In: Speck, M.L. (Ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, American Experiment Station. Public Health Association, Washington, DC, 112–123.

Raybaudi-Massilia, R.M., Mosqueda-Melgar, J., Martín-Belloso, O., (2009). Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **8**, 157–180.

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

Reissbrodt, R., Vielitz, E., Kormann, E., Rabsch, W., Kuhn, H., (1996). Ferrioxamine E-supplemented pre-enrichment and enrichment media improve various isolation methods for *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.*, **29**, 81–91.

Rodrigue, D.C., R.V. Tauxe, and B. Rowe, (1990). International increase in *Salmonella enteritidis* phage type 4: A new pandemic? *Epidemiol. Infect.*, **105**, 21-27.

Rodriguez, R.A, Pepper, I.L and Gerba, C.P, (2009). Application of PCR-based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 297-307.

Rose, J.B., Epstein, P.R., Lipp, E.K., Sherman, B.H., Bernard, S.M. and Patz, J.A, (2001). Climate variability and change in the United States: potential impacts on water- and foodborne diseases caused by microbiologic agents. *Environmental Health Perspectives*, **109 Suppl 2**, 211-221.

Rostagno, M.H., Callaway, T.R. (2011). Pre-harvest risk factors for *Salmonella enterica* in pork production. *Food Research International*, **45**, 634-640.

Ryan, M.J, Wall, P.J, Gilbert R.J, Griffin , M., Rowe B. (1997). Risk factors for outbreaks of infectious intestinal disease linked to domestic catering. *Communicable Disease Report CDR Review* 13, R179-182.

Sagoo, S. K., Little, C. L., Ward, L., Gillespie, I. A., & Mitchell, R. T. (2003). Microbiological study of ready-to-eat salad vegetables from retail establishments uncovers a national outbreak of salmonellosis. *Journal of Food Protection*, **66**, 403-409.

Sagoo, S.K, Little, C.L and Mitchell, R.T, (2003a). Microbiological quality of open ready-to-eat salad vegetables: Effectiveness of food hygiene training of management. *Journal of Food Protection*, **66**, 1581-1586.

Sagoo, S.K, Little, C.L, Ward, L., Gillespie, I.A and Mitchell, R.T, (2003b). Microbiological study of ready-to-eat salad vegetables from retail establishments uncovers a national outbreak of salmonellosis. *Journal of Food Protection*, **66**, 403-409.



Sant'Ana, A.S., Landgraf, M., Destro, M.T., Franco, B.D.G.M., (2011). Prevalence and counts of *Salmonella* spp. in minimally processed vegetables in Sao Paulo, Brazil. *Food Microbiology*, **28**, 1235-1237.

Sant'Ana A., Barbosa M., Destro M.T., Landgraf M., Franco B.D.G.M. (2012). Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*, **157**, 52-58.

Sapers, G. M. (2001). Efficacy of washing and sanitizing methods. *Food Technology and Biotechnology*, **39**, 305–311.

Sapers, G.M, Gorny, J.R and Yousef, A.E (2006). Microbiology of fruits and vegetables. CRC Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, USA. 648 pp.

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

Schikora, A., Virlogeux-Payant, I., Bueso, E., Garcia, A. V, Nilau, T., Charrier, A., Pelletier, S., Menanteau, P., Baccarini, M., Velge, P., Hirt, H., (2011). Conservation of *Salmonella* infection mechanisms in plants and animals. *PLoS One*, **6**, e24112. doi:10.1371/journal.pone.0024112

Schikora, A., Garcia, A. V., Hirt, H. (2012). Plants as alternative hosts for *Salmonella*. *Trends Plant Science*, **17**, 245-249.

Schroeder, J.I., Allen, G.J., Hugouvieux, V., Kwak, J.M., and Waner, D.(2001). Guard cell signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **52**, 627–658.

Semenov, A.V., van Bruggen, A.H., van Overbeek, L., Termorshuizen, A.J and Semenov, A.M, (2007). Influence of temperature fluctuations on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in cow manure. *FEMS Microbiology Ecology*, **60**, 419-428.

Semenza, J.C and Menne, B, (2009). Climate change and infectious diseases in Europe. *Lancet Infectious Diseases*, **9**, 365-375.

Seo, K.H, and Frank, J. H, (1999). Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to lettuce leaf surface and bacterial viability in response to chlorine treatment as demonstrated by using confocal scanning laser microscopy. *J. Food Prot.* **62**:3-9.

Severi E, Booth L, Johnson S, Cleary P, Rimington M, Saunders D, Cockcroft P, Ihekweazu C. (2012). Large outbreak of *Salmonella enteritidis* PT8 in Portsmouth, UK, associated with a restaurant. *Epidemiol Infect.*, **140**, 1748-56.

Sewell, A.M., Farber, J.M.,( 2001.) Foodborne outbreaks in Canada linked to produce. *Journal of Food Protection*, **64**, 1863–1877.

Shaw, R. K., Berger, C. N., Feys, B., Knutton, S., Pallen, M. J., & Frankel, G. (2008). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* exploits EspA filaments for attachment to salad leaves. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 2908–2914.

Shea, J. E., Hensel, M., Gleeson, C., Holden, D. W., (1996) .Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 2593–2597.

Shen, C., Luo, Y., Nou, X., Wang, Q and Millner, P, (2013). Dynamic effects of free chlorine concentration, organic load, and exposure time on the inactivation of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli*. *Journal of Food Protection*, **76**, 386-393.

Singh, B. R., Chandra, M., & Agarwal, R. (2005). Interaction of *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar typhimurium and Mung bean (*Phaseolus aureus*) plants. *Journal of Food Protection*, **68**, 476–481.

Singh, B. R., Chandra, M., Agarwal, R., & Babu, N. (2007). Interactions between *Salmonella enterica* subspecies Enterica serovar typhimurium and cowpea (*Vigna*

*unguiculata* variety sinensis) seeds, plants and persistence in hay. *Journal of Food Safety*, **27**, 169–187.

Sivapalasingam, S., Friedman, C. R., Cohen, L., & Tauxe, R. V. (2004). Fresh produce: A growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *Journal of Food Protection*, **67**, 2342–2353.

Soderstrom, A., Osterberg, P., Lindqvist, A., Jonsson, B., Lindberg, A., Blide Ulander, S., Welinder-Olsson, C., Lofdahl, S., Kaijser, B., De Jong, B., Kuhlmann-Berenzon, S., Boqvist, S., Eriksson, E., Szanto, E., Andersson, S., Allestam, G., Hedenstrom, I., Ledet Muller, L. and Andersson, Y, (2008). A large *Escherichia coli* O157 outbreak in Sweden associated with locally produced lettuce. *Foodborne Pathog Dis*, **5**, 339-349.

Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Alley, R.B., Berntsen, T., Bindoff, N.L., Chen, Z., Chidthaisong, A., Gregory, J.M., Hegerl, G.C., Heimann, M., Hewitson, B., Hoskins, B.J., Joos, F., Jouzel, J., Kattsov, V., Lohmann, U., Matsuno, T., Molina, M., Nicholls, N., Overpeck, J., Raga, G., Ramaswamy, V., Ren, J., Rusticucci, M., Somerville, R., Stocker, T.F, Whetton, P., Wood, R.A and Wratt, D., (2007). Technical summary. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* Eds Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

Solomon, E. B., Yaron, S., & Matthews, K. R. (2002). Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 397–400.

Stafford, R.J, McCall, B.J., Neill, A.S., Leon, D.S., Dorricott, G.J., Towner, C.D. and Micalizzi, G.R., (2002). A statewide outbreak of *Salmonella* bovisorbificans phage type 32 infection in Queensland. *Communicable diseases intelligence quarterly report*, **26**, 568-573.

Staskawicz, B.J., Mudgett, M.B., Dangel, J.L., and Galan, J.E. (2001). Common and contrasting themes of plant and animal diseases. *Science*, **292**, 2285–2289.

Strawn, L.K., Fortes, E.D., Bihn, E.A., Nightingale, K.K., Groehn, Y.T., Worobo, R.W., Wiedmann, M. and Bergholz, P.W., (2013a). Landscape and meteorological factors affecting prevalence of three food-borne pathogens in fruit and vegetable farms. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**, 588-600.

Strawn, L.K., Grohn, Y.T., Warchocki, S., Worobo, R.W., Bihn, E.A and Wiedmann, M., (2013b). Risk factors associated with *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* contamination of produce fields. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**, 7618-7627.

Suslow, T.V., Oria, M.P., Beuchat, L.R., Garrett, E.H., Parish, M.E., Harris, L.J, Farber, J.N and Busta, F.F, (2003). Production practices as risk factors in microbial food safety of fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, Supplement s1, 38-77.

Suslow, T.V. (2004). Ozone applications for postharvest disinfection of edible horticultural crops, Publication 8133, Available online: <http://anrcatalog.ucdavis.edu/pdf/8133.pdf>.

Suslow, T.V, (2010). Standards for irrigation and foliar contact water. An Initiative of 1246 The Pew Charitable Trusts at Georgetown University. Peer-Reviewed Issue. Available online: <http://www.producesafetyproject.org/admin/assets/files/Water-Suslow-1.pdf>.

Takkinen, J., U. M. Nakari, T. Johansson, T. Niskanen, A. Siitonen, and M. Kuusi. (2005). A nationwide outbreak of multiresistant *Salmonella* Typhimurium in Finland due to contaminated lettuce from Spain. *Euro. Surveill.* **10**:E050630.1

Talley, J. L., Wayadande, A. C., Wasala, L. P., Gerry, A. C., Fletcher, J., De Silva, U., Gilliland, S. E. (2009). Association of *Escherichia coli* O157:H7 with filth flies (*Muscidae* and *Calliphoridae*) captured in leafy greens fields and experimental transmission of *E. coli* O157:H7 to spinach leaves by house flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Food Protection*, **72**, 1547-1552.

Tauxe, R., Kruse, H., Hedberg, C., Potter, M., Madden, J., Wachsmuth, K., (1997). Microbial hazards and emerging issues associated with produce. In a preliminary report to the national advisory committee on Microbiologic Criteria for Foods. *Journal of Food Protection*, **60**, 1400–1408.

Teltsch, B and Katzenelson, E, (1978). Airborne enteric bacteria and viruses from spray irrigation with wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*, **35**, 290-296.

Tirado, M.C., Clarke, R., Jaykus, L.A, McQuatters-Gollop, A. and Frank, J.M, (2010). Climate change and food safety: a review. *Food Research International*, **43**, 1745-1765.

Tournas V.H. (2005). Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts. *International Journal of Food Microbiology* ,**99**, 71-77

Turner, N. C., and A. Graniti. (1969). Fusicoccin: a fungal toxin that opens stomata. *Nature*, **223**, 1070–1071.

Varma, J.K, Greene, K.D, Reller, M.E, DeLong, S.M, Trottier, J., Nowicki, S.F, DiOrio, M., Koch, E.M, Bannerman, T.L, York, S.T, Lambert-Fair, M.A, Wells, J.G and Mead, P.S, (2003). An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection following exposure to a contaminated building. *The Journal of the American Medical Association*, **290**, 2709-2712.

Vescovo, M., Orsi, C., Scolari, G., & Torriani, S. (1995). Inhibitory effect of selected lactic acid bacteria on microflora associated with ready-to-use vegetables. *Letters in Applied Microbiology*, **427**, 121-125.

Warner, R.D., Carr, R.W., McCleskey, F.K., Johnson, P.C., Elmer, L.M.G., Davison, V.E., (1991). A large nontypical outbreak of Norwalk virus e gastroenteritis associated with exposing celery to nonpotable water and with *Citrobacter freundii*. *Arch.Intern. Med.*, **151**, 2419e2424.

Warriner K., Spaniolas S., Dickinson M., Wright C., Waites W.M.(2003). Internalization of bioluminescent *Escherichia coli* and *Salmonella* Montevideo in growing bean sprouts. *J Appl Microbiol.*, **95**, 719-27.

Wei, H., Wolf, G., & Hammes, W. P. (2006). Indigenous microorganisms from iceberg lettuce with adherence and antagonistic potential for use as protective culture. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, **7**, 294-301.

Yadav, R.K., Karamanoli, K., and Vokou, D., (2005). Bacterial colonization of the phyllosphere of mediterranean perennial species as influenced by leaf structural and chemical features. *Microb Ecol*, **50**, 185-196.

Weng, C.J., Yen, G.C., (2012). Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treatment Reviews*, **38**, 76–87.

Westrell, T., Ciampa, N., Boelaert, F., Helwich, B., Korsgaard, H., An Chriél, M. (2009). Zoonotic infections in Europe in 2007: a summary of the EFSA-ECDC annual report. *Euro Surveill* 14: pii=19100.

Winfield M.D and Groisman E.A. (2004). Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* **69(7)**:3687-94.

Yadav, R.K.P., Karamanoli, K., Vokou, D., (2005). Bacterial colonization of the phyllosphere of Mediterranean perennial species as influenced by leaf structure and chemical features. *Microbial Ecology*, **50**, 185–196.

Yang, Y., Luo, Y., Millner, P., Turner, E and Feng, H, (2012). Assessment of *Escherichia coli* O157:H7 transference from soil to iceberg lettuce via a contaminated field coring harvesting knife. *International Journal of Food Microbiology*, **153**, 345-350.

Yousef, A. E. and Carlstrom, C. (2003). *Salmonella*. In Yousef, A. E. and Carstrom, C. (Eds.). *Food Microbiology: A laboratory manual*, p. 167-205. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.

Zeidler, D., Zahringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P., Durner, J. (2004). Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides 149 activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *PNAS*, **101**: 15811-15816.

Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D., Felix, G., and Boller, T. (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, **428**, 764–767.

Zhuang, R-H., L.R. Beuchat, and F.J. Angelo, (1995). Fate of *Salmonella montevideo* on and in raw tomatoes as affected by temperature and treatment with chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 105-107.

Zhang, Y., Bi, P and Hiller, J.E, (2010). Climate variations and *Salmonella* infection in Australian subtropical and tropical regions. *Science of the Total Environment*, **408**, 524-530.

Αντωνιάδης ΑΓ, Καρτάλη Σ, Λεγάκης ΝΙ, Μανιάτης ΑΝ, Τσελέντης Ι. (2000). *Ιατρική μικροβιολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη.*  
Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.), Τμήμα Επιδημιολογικής Επιτήρησης και Παρέμβασης. <http://www.keelpno.gr>

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα

ΚΕΛΠΙΝΟ (2013). Επιδημιολογικά δεδομένα για τη Σαλμονέλλωση (μη-παρατυφική) στην Ελλάδα 2004-2013. [www.keelpno.gr](http://www.keelpno.gr)

Κοτζεκίδου-Ρούκα Π. (2003). Μικροβιολογική ανάλυση τροφίμων. Υπηρεσία δημοσιευμάτων Α.Π.Θ., σελ: 50, 102.

Μπαλατσούρας Γ. (2006). Μικροβιολογία Τροφίμων

Νυχάς Γ.-Ι. Ε., Σημειώσεις στη Μικροβιολογία Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, 37, 54-55, 64-65, 68-69, 118-121.

Ολύμπιος Χ.Μ (2007). Στοιχεία Γενικής Λαχανοκομίας. Τμήμα Φυτικής Παραγωγής. Εργαστήριο Κηπευτικών Καλλιεργειών., σελ: 1-9.















